

(11)Publication number : 06-007160
(43)Date of publication of application : 18.01.1994

C12N 9/12
C12N 15/54
C12N 15/67
C12Q 1/68
/(C12N 15/54
C12R 1:01)

(71)Applicant : NEW ENGLAND BIOLABS INC
(72)Inventor : COMB DONALD G
PERLER FRANCINE
KUCERA REBECCA
JACK WILLIAM E

Priority number : 91 811421 Priority date : 18.12.1991 Priority country : US

CONSTITUTION: A genome library is prepared from archaeobacteria, and a DNA obtained by transforming or transfecting appropriate host cells using the genome library is contacted with a DNA probe selected from the group consisting of nucleotides 1-1274, 1269-2856, and 2851-4771; and the above resultant host cells hybridizable with the DNA probe are assayed for DNA polymerase activity and a DNA fragment encoding the aimed thermostable DNA polymerase is isolated. Subsequently, host cells are transformed by a cloning vector including the isolated DNA followed by culturing the transformed cells under conditions suitable for the expression of the DNA polymerase.

[illegible]

[Date of request for examination]	14.09.1999
[Date of sending the examiner's decision of rejection]	
[Kind of final disposal of application other than the examiner's decision of rejection or application converted registration]	
[Date of final disposal for application]	
[Patent number]	
[Date of registration]	
[Number of appeal against examiner's decision of rejection]	
[Date of requesting appeal against examiner's decision of rejection]	
[Date of extinction of right]	

01/08/03

(19)日本国特許庁(J P)

(12) 公 開 特 許 公 報 (A)

(11)特許出願公開番号

特開平6-7160

(43)公開日 平成6年(1994)1月18日

(51)Int.Cl. ⁵	識別記号	庁内整理番号	F I	技術表示箇所
C 1 2 N 9/12	Z N A	9161-4B		
15/54				
15/67				
C 1 2 Q 1/68	A	7823-4B		
		8931-4B		
			C 1 2 N 15/ 00	A
			審査請求 未請求 請求項の数22(全 52 頁)	最終頁に続く

(21)出願番号 特願平4-355752

(22)出願日 平成4年(1992)12月18日

(31)優先権主張番号 8 1 1 4 2 1

(32)優先日 1991年12月18日

(33)優先権主張国 米国(U S)

(71)出願人 592239707

ニュー・イングランド・バイオレイブズ・
インコーポレイテッド

アメリカ合衆国、マサチューセッツ・
01915、ビバリー、トザー・ロード・32

(72)発明者 ドナルド・ジー・コーム

アメリカ合衆国、マサチューセッツ・
01915、ビバリー、ウォーター・ストリー
ト・109

(74)代理人 弁理士 川口 義雄 (外2名)

最終頁に続く

(54)【発明の名称】 古細菌からの組換え熱安定性DNAポリメラーゼ

(57)【要約】

【構成】古細菌からの組換えDNAポリメラーゼ類、並びに、このようなポリメラーゼ類をコードする単離されたDNAを提供する。単離されたDNAは、各々、T、リトリスDNAポリメラーゼをコードするDNAから調製されるDNAもしくは抗体プローブ、及び、T、リトリスDNAポリメラーゼの使用により取得する。

【効果】組換え古細菌熱安定性DNAポリメラーゼを産生する方法、及び、このようなDNAポリメラーゼをコードするDNA内に含まれるイントロンの同定、位置決定、及び、除去による、このようなポリメラーゼ類の発現の増幅化のための方法をも提供する。

【特許請求の範囲】

【請求項1】 Fig. 6のヌクレオチド配列もしくはその一部分、Fig. 6のヌクレオチド1から1274まで、Fig. 6のヌクレオチド1269から2856まで、及び、Fig. 6のヌクレオチド2851から4771までからなる群から選択されるヌクレオチド配列に対してハイブリッド形成するDNA配列によりコードされている、古細菌からの組換え熱安定性DNAポリメラーゼ。

【請求項2】 Fig. 6のヌクレオチド配列の一部分が少なくとも約20ヌクレオチド分の長さである、請求項1の組換え熱安定性ポリメラーゼ。

【請求項3】 Fig. 6のヌクレオチド配列の部分が少なくとも約50ヌクレオチド分の長さである、請求項1の組換え熱安定性ポリメラーゼ。

【請求項4】 Fig. 6のヌクレオチド配列の部分が少なくとも約150ヌクレオチド分の長さである、請求項1の組換え熱安定性ポリメラーゼ。

【請求項5】 *T. リトラリス* (*T. litoralis*) のDNAポリメラーゼに対する抗原特異性を有する抗体プローブに対してハイブリッド形成する、古細菌からの組換え熱安定性DNAポリメラーゼ。

【請求項6】 実施例1の組換え熱安定性DNAポリメラーゼをコードする、単離されたDNA。

【請求項7】 請求項6の単離されたDNAを含むクローニングベクター。

【請求項8】 請求項7のベクターにより形質転換させられた宿主細胞。

【請求項9】 古細菌からの組換え熱安定性DNAポリメラーゼを産生させるための方法であって、そのDNAポリメラーゼの発現に適する条件下において、請求項7のベクターで形質転換させた宿主細胞を培養することを含む、上記方法。

【請求項10】 請求項1の古細菌熱安定性DNAポリメラーゼをコードするDNA配列に対してハイブリッド形成するDNAプローブであって、このDNAプローブが、Fig. 6のヌクレオチド配列もしくはその一部分、Fig. 6のヌクレオチド1から1274まで、Fig. 6のヌクレオチド1269から2856まで、及び、Fig. 6のヌクレオチド2851から4771までからなる群から選択される、上記DNAプローブ。

【請求項11】 請求項10のDNAプローブであって、Fig. 6のヌクレオチド配列の一部分が少なくとも約20ヌクレオチド分の長さである、上記DNAプローブ。

【請求項12】 請求項10のDNAプローブであって、Fig. 6のヌクレオチド配列の一部分が少なくとも約50ヌクレオチド分の長さである、上記DNAプローブ。

【請求項13】 請求項10のDNAプローブであって、Fig. 6のヌクレオチド配列の一部分が少なくとも約

150ヌクレオチド分の長さである、上記DNAプローブ。

【請求項14】 以下の段階：

- (a) 古細菌からゲノムライブラリーを形成すること；
- (b) 適切な宿主細胞を、段階(a)からのライブラリーで形質転換もしくはトランスフェクトさせること；
- (c) 形質転換もしくはトランスフェクトさせた宿主細胞からのDNAを、Fig. 6のヌクレオチド配列もしくはその一部分、Fig. 6のヌクレオチド1から1274まで、Fig. 6のヌクレオチド1269から2856まで、及び、Fig. 6のヌクレオチド2851から4771までからなる群から選択されるDNAプローブと接触させること；

(d) そのDNAプローブに対してハイブリッド形成する、段階(c)の形質転換もしくはトランスフェクトさせた細胞を、DNAポリメラーゼ活性についてアッセイすること；及び、

(e) 熱安定性DNAポリメラーゼをコードするDNA断片を単離すること、を含む、古細菌からの熱安定性DNAポリメラーゼをコードするDNAを単離するための方法。

【請求項15】 以下の段階：

- (a) 古細菌からゲノムライブラリーを形成すること；
- (b) 適切な宿主細胞を、段階(a)からのライブラリーで形質転換もしくはトランスフェクトさせること；
- (c) 形質転換もしくはトランスフェクトさせた宿主細胞からの抽出物を、*T. リトラリス* DNAポリメラーゼについての特異的親和性を有する抗体プローブと接触させること；

(d) その抗体プローブに交差反応する、段階(c)の形質転換もしくはトランスフェクトさせた細胞を、DNAポリメラーゼ活性についてアッセイすること；及び、

(e) 熱安定性DNAポリメラーゼをコードするDNA断片を単離すること、を含む、古細菌からの熱安定性DNAポリメラーゼをコードするDNAを単離するための方法。

【請求項16】 以下の段階：

- (a) 請求項14もしくは15の単離されたDNA中の任意の介在ヌクレオチド配列を同定しかつ位置を決定すること；及び、

(b) この単離されたDNAから介在ヌクレオチド配列を除去すること、を含む、古細菌からの熱安定性DNAポリメラーゼの発現を増加させる方法。

【請求項17】 古細菌が*T. リトラリス*を含む、請求項16の方法。

【請求項18】 介在ヌクレオチド配列が、IVS1、IVS2、もしくは、IVS1とIVS2の群から選択される、請求項17の方法。

【請求項19】 *T. リトラリス* DNAポリメラーゼをコードするDNA配列からのイントロンをコードするD

NAプローブを用いて、介在ヌクレオチド配列の同定及び位置を決定する、請求項16の方法。

【請求項20】 DNAプローブが、ヌクレオチド1776から3389までもしくはその一部分を含むFig. 6の1614bpのヌクレオチド配列、及び、ヌクレオチド3544から4703もしくはその一部分を含むFig. 6の1170bpのヌクレオチド配列からなる群より選択される、請求項19の方法。

【請求項21】 位置164及び2411において二重らせんのデオキシヌクレオチド酸pBR 322を切断する、T. リトラリスから取得することができる熱安定性エンドヌクレアーゼ。

【請求項22】 約33,000-37,000の分子量を有する、請求項21のエンドヌクレアーゼ。

【発明の詳細な説明】

【0001】

【産業上の利用分野】本発明は、古細菌からの組換えDNAポリメラーゼ、T. リトラリスDNAポリメラーゼをコードするDNA配列から調製されるDNAプローブに対してハイブリッド形成する当該DNAポリメラーゼをコードする単離されたDNA、当該DNAの単離に利用されるDNA及び抗体プローブに関し、同様に、当該DNAを単離するための方法、及び、当該DNAポリメラーゼの発現を増幅させる目的で、当該DNA内に含まれる介在ヌクレオチド配列を同定し、位置を決定し、かつ、除去するための方法に関する。

【0002】関連特許出願に対する相互引用文献

本発明は、1991年4月17日に提出された米国特許出願、整理番号No. : 07/686,340の継続部分であり、これは、1990年12月11日に提出された米国特許出願、整理番号No. : 07/626,057の継続部分であり、これは、1990年4月26日に提出された米国特許出願、整理番号No. : 07/513,994の継続部分である。

【0003】発明の背景

DNAポリメラーゼは、DNA修復及び複製に関連する酵素類の一種である。大腸菌 (*E. coli*) のような中温性微生物からのDNAポリメラーゼ類の単離については広範囲の研究が行われてきた。例えば、Bessman, et al., *J. Biol. Chem.* (1957) 233:171-177、及び、Buttin and Kornberg *J. Biol. Chem.* (1966) 241:5419-5427を参照せよ。

【0004】大腸菌から単離されたDNAポリメラーゼの例には、大腸菌のDNAポリメラーゼI、大腸菌のDNAポリメラーゼIのクレノウ断片、及び、T4 DNAポリメラーゼがある。これらの酵素は、例えば、ニックトランスレーションによるDNAのラベル化、cDNAクローニングにおける第2鎖cDNA合成、及び、DNAの配列決定を含む、組換えDNA技術における多様な用途を有する。Maniatis, et al., *Molecular Cloning: A Laboratory Manual* (1982)を参照せよ。

【0005】最近、米国特許番号4,683,195、4,683,202、及び、4,800,159が、核酸配列を増幅、検出、及び/又は、クローニングするための方法における上記酵素の用途を開示した。この方法は、共通して、ポリメラーゼ連鎖反応 (PCR) として引用されており、存在する核酸配列の増幅に対する、ポリメラーゼ類、プライマー類、及び、ヌクレオチド三リン酸類の用途を含む。

【0006】先に論議した幾つかのDNAポリメラーゼ類は、合成がある一つの塩基対形成選択段階のみの結果である場合よりも、かなり高い忠実性をDNA複製に付与するブルーフリーディング機能を提供する、3'-5'エキソヌクレアーゼ活性を所有する。Burtlag, D. and Kornberg, A., *J. Biol. Chem.*, (1972) 247:241-248。3'-5'ブルーフリーディングエキソヌクレアーゼ活性を有するDNAポリメラーゼ類は、非ブルーフリーディングエキソヌクレアーゼ所有ポリメラーゼと比較する場合、実質的に、より低い塩基取り込み過誤率を有する。Chang, L.M.S., *J. Biol. Chem.*, (1977) 252:1873-1880。

【0007】セルムス・アクアティクス (*Thermus aquaticus*) のような好熱性生物からのDNAポリメラーゼ類の同定及び精製についても研究が行われてきた。Chien, A., et al. *J. Bacteriol.*, (1976) 127:1550-1557、は、T. アクアティクス (*T. aquaticus*) YT1株からの80℃の至適温度を有するDNAポリメラーゼの同定及び精製を開示している。このChien, et al., の精製法は4段階の過程を必要とする。これらの段階は、未精製抽出物の調製、DEAEセファデックスクロマトグラフィー、フォスフォセルロースクロマトグラフィー、及び、DNAセルロース上でのクロマトグラフィー、を含む。Kaledin, et al., *Biokhymiyay* (1980) 45:644-651、も又、T. アクアティクスYT1株の細胞類からのDNAポリメラーゼの同定及び精製を開示している。このKaledin, et al. の精製法は6段階の過程を必要とする。これらの段階は、未精製抽出物の単離、硫酸アンモニウム沈殿、DEAEセルロースクロマトグラフィー、ヒドロキシアパタイト上での分画化、DEAEセルロース上での分画化、及び、1本鎖のDNA-セルロース上でのクロマトグラフィーを含む。

【0008】米国特許番号4,889,818は、T. アクアティクスからの精製した熱安定性DNAポリメラーゼ、つまり、1本鎖DNA-セルロース上でのクロマトグラフィーの代わりにフォスフォセルロースクロマトグラフィーを代用することを付け加えた、Kaledinの方法に実質的に等しい方法により調製される、約86,000から90,000ダルトンの分子量を有するTaqポリメラーゼを開示している。更に、欧州特許出願0258017は、先に論議したPCR法における用途に好ましい酵素としてのTaqポリメラーゼを開示している。

【0009】研究により、Taqポリメラーゼが5'→3'ポリメラーゼ依存的エキソヌクレアーゼ機能を有するにもかかわらず、このTaqDNAポリメラーゼは3'→5'ブルーフリーディングエキソヌクレアーゼ機能を所有しないことが示されている。Lawyer, F.C., et al. J. Biol. Chem., (1989) 264: 11, p. 6427-6437. Bernard, A., et al. Cell (1989) 59: 219. その結果、TaqDNAポリメラーゼは塩基取り込み過誤を生じさせる傾向にあり、特定の応用法におけるその用途を望ましくないものになっている。例えば、遺伝子の任意の1コピーがランダムな誤った取り込みのために過誤を含むことができるため、増幅された遺伝子をクローン化する試みは未解決である。複製周期のどこで過誤が生じるかによって（例えば、初期複製周期において）、増幅される完全なDNAは、誤って取り込んだ塩基を含み、従って、突然変異した遺伝子産物を生じる。更に、研究により、TaqDNAポリメラーゼは、100℃においては、数種の突然変異体ほどの熱安定性を有さないことが示された。

【0010】従って、比較用のもしくは改善された熱安定性、及び／又は、3'から5'へのエキソヌクレアーゼブルーフリーディング活性を有する他のDNAポリメラーゼ類が、科学団体にとって望まれるところのものである。このような酵素の一つである（以下により詳細に記載してある）、セルモコッカス・リトラリス（*Thermococcus litoralis*）、つまり、海底熱火道付近で100℃に近い温度で増殖する古細菌からのDNAポリメラーゼを大腸菌内にクローン化した。しかしながら、この遺伝子からのこの組換え酵素蛋白質の大量産生は2つのイントロンの存在により複雑化されており、その一つは、遺伝子工学技術により除去する必要がある、更に、もう一方のものは、大腸菌内からスプライスされてくるエンドヌクレアーゼをコードする。

【0011】先に記載したDNAポリメラーゼ法を改善するような、3'から5'方向へのブルーフリーディング活性、及び／又は、比較用のもしくは改善された熱安定性を有する古細菌からの、他の高度に熱安定性なDNAポリメラーゼ類を取得及び産生することが希望される。

【0012】発明の要約

本発明に従って、古細菌からのDNAポリメラーゼをコードするDNAを同定、単離、及び、クローニングするための方法及び産物が提供される。本発明は、又、古細菌からの組換えDNAポリメラーゼ類、並びに、当該ポリメラーゼ類をコードするDNA内に存在する介在ヌクレオチド配列類もしくはイントロン類を同定、位置決定、及び、除去することによる、当該組換えDNAポリメラーゼ類の発現を改善するための方法に関する。

【0013】より具体的には、本発明に従って、古細菌からのDNAポリメラーゼ類をコードするDNAは、D

NA及びアミノ酸レベルの両方において、実質的な同一性を有することが発見された。又、このような酵素類をコードする古細菌からのDNAは、やはりDNAレベルにおける実質的な相同性を共有する1つもしくは複数の介在ヌクレオチド類もしくはイントロン類を有するように思われることが発見された。

【0014】従って、本発明に従い、セルモコッカス・リトラリスのような古細菌からの1種類のDNAポリメラーゼをコードするDNA配列からDNAプローブ類を作製することができ、かつ、これを使用して、ピロコッカス（*Pyrococcus*）のような他の古細菌からのDNAポリメラーゼ類をコードするDNAを同定及び単離することができる。同様に、T. リトラリスDNAポリメラーゼと交差反応する抗体プローブ類を使用してもやはり、このような他のポリメラーゼ類を発現するコーディング配列をコードするDNAを同定することができる。

【0015】一度、標的DNAポリメラーゼをコードするDNAが単離したら、それを使用して、標的DNAポリメラーゼの商業的な量を産生する目的で発現ベクター類を作製することができる。これに関して、本発明は更に、このDNAポリメラーゼをコードするDNA配列中に存在する任意の介在ヌクレオチド配列類もしくはイントロン類を、同定、位置決定、及び、除去することによる、標的DNAポリメラーゼの発現レベルを増加させる方法をも提供する。以下に記載するように、大腸菌内においては特定のイントロン類はスプライシングされて（切り出されて）くるものの、組換えDNAポリメラーゼの発現を、大腸菌内における発現の以前のこのような介在ヌクレオチド配列の除去により増幅させることができる。

【0016】発明の詳細な説明

本発明のある好ましい実施態様に従って、古細菌から組換えDNAポリメラーゼを産生する方法が提供される。好ましい方法は、1) 標的固体菌からゲノムライブラリーを形成する、2) 適切な宿主細胞を形質転換もしくはトランスフェクションさせる、3) i) 形質転換もしくはトランスフェクトさせた宿主細胞からのDNAを、T. リトラリスからのDNAポリメラーゼをコードするDNAに対してハイブリッド形成するDNAプローブと反応させるか、あるいは、ii) 形質転換もしくはトランスフェクトさせた宿主細胞からの抽出物を、T. リトラリスDNAポリメラーゼと交差反応する抗体プローブと反応させるか、のいずれか、4) DNAプローブに対してハイブリッド形成するか、あるいは、T. リトラリス特異的抗体と交差反応するかのいずれかである、段階3の形質転換もしくはトランスフェクトさせた細胞を、熱安定性DNAポリメラーゼ活性についてアッセイすることを含む。

【0017】前述の方法は、古細菌からの組換えDNAポリメラーゼ類の産生、並びに、当該ポリメラーゼ類を

コードするDNAの単離を考慮にいれている。

【0018】他の好ましい実施態様に従い、古細菌からの組換えDNAポリメラーゼ類の発現を増幅させるための方法が提供される。先に記載したように、古細菌からのDNAポリメラーゼをコードするDNAは、標的組換えDNAポリメラーゼの発現を複雑にすることができる1つもしくは複数のイントロンを所有することができる。発現系の作製以前のこれらのイントロン類の位置決定及び除去により、イントロンがその宿主細胞内で標準的にスプライシングされてくる場合でさえも、標的DNAポリメラーゼの発現を増幅させることが発見された。以下により詳しく論議しているように、イントロンは、数々の方法において同定及び除去することができる。特に、*T. リトラリス*のイントロンは、*ピロコッカス*のような他の属の古細菌と、DNAレベルにおいて実質的な相同性を共有することも発見した。この事実の見識により、以下により詳しく記載されている方法によるイントロンの同定、位置決定、及び、除去が容易になるはずである。

【0019】本発明の実際の特定の実施態様の実施に当たり、i) *T. リトラリス*DNAポリメラーゼをコードするDNAに対してハイブリッド形成するDNAプローブ、あるいは、ii) *T. リトラリス*DNAポリメラーゼと交差反応する抗体、のいずれかを利用することが好ましい。DNAプローブを、*T. リトラリス*DNAポリメラーゼをコードするDNA配列に基づいて作製することが好ましく (Fig. 6を参照せよ)、一方、抗体プローブは、精製した*T. リトラリス*酵素そのものの自体から作成することが好ましい。本発明の方法に従い、当然のことながら、他の源の古細菌からのDNAポリメラーゼもしくはそのDNAを基にしてプローブ類を作製することができる。しかしながら、このようなプローブ類を作製するのに用いる好ましいDNAポリメラーゼ及びDNAは、*T. リトラリス*からのものである。

【0020】

天然の*T. リトラリス*DNAポリメラーゼの産生

*T. リトラリス*DNAポリメラーゼは、*T. リトラリス*株NS-Cから取得可能である (DSM No. 5473、この試料は、アメリカン タイプ カルチャーコレクションに、ATCC受託番号No. 55233として、1991年9月17日に寄託してもある)。*T. リトラリス*は、1985年、イタリア、ナポリ付近の海底熱火道から単離された。この生物、*T. リトラリス*は、極度に好熱性であるイオウ代謝性の古細菌であり、55℃と98℃との間に増殖範囲を有する。Neuner, et al., Arch. Microbiol. (1990)。

【0021】天然の蛋白質を回収するために、*T. リトラリス*を、Belkin, et al., Arch Microbiol. (1985) 142: 181-186、により記載されている技術のような任意の適切な技術にを用いて増殖させることができ、その

開示は、引用文献として本明細所内に取り込んでである。簡潔には、10mg/mlのイオウ及び0.01Mのシステインを含む先に記載した培地中で、15ml中のねじ蓋式の試験管内で、95℃で2日間、細胞を増殖させる。より大量の細胞が必要な場合には、1リットルのねじ蓋式容器を用い、かつ、滅菌後に、新しく作成した10mlの培養物で接種し、更に、90-95℃で、2日間増殖させる。

【0022】細胞増殖後、以下に示すような多段階法を使用して、酵素の単離及び精製のための、ある好ましい方法を行う：最初に、細胞を、もし凍結しているのであれば解凍させて、バッファーA (10mMのKPO₄ バッファー、PH7.4; 1.0mMのEDTA、1.0mMのβ-メルカプトエタノール)のような適切なバッファー中に懸濁し、超音波処理し、更に、遠心する。その後、この上清を、アフィゲル ブルー カラム (バイオラド社)のような、核酸に結合する蛋白質類について高い親和性を有するカラムを通過させる。カラムの数倍の容積の約7.0のpHの低塩バッファーでカラムを洗浄することにより、*T. リトラリス*の上清溶液中に存在する核酸、及び、カラムを通過する多くの蛋白質を除去する。洗浄後、バッファーA中に含まれる0.1から2.0MのNaClのような直線濃度勾配で酵素を溶出する。ピークのDNAポリメラーゼ活性を透析し、更に、フォスフォセルロースカラムに供する。カラムを洗浄し、更に、バッファーA中に含まれる0.1から1.0MのNaClのような直線濃度勾配液で酵素を溶出する。DNAポリメラーゼ活性を含む分画をまとめにし、バッファーAに対して透析し、更に、高速液体クロマトグラフィー (HPLC) のモノ-Qカラム (陰イオン交換体) に供する。酵素を再び、バッファーA中に含まれる0.05から1.0MのNaClのような直線濃度勾配液で酵素を溶出する。DNAポリメラーゼ活性を含む分画をまとめにし、透析し、更に、HPLC モノ-Sカラム (陽イオン交換体) に供する。酵素を再び、バッファーA中に含まれる0.05から1.0MのNaClのような直線濃度勾配液で溶出する。この段階においては、酵素は約50%の純度である。この酵素を、50mMのNaClを補足したバッファーAに対して繰り返し透析することによる混入低分子量蛋白質の沈殿化により更に精製することができる。*T. リトラリス*から取得することができるDNAポリメラーゼの見かけの分子量は、97,400ダルトンの分子量が割り当てられているフォスフォリラーゼBのような既知の分子量の蛋白質標準物類と比較した場合、約90,000から95,000ダルトンの間である。しかしながら、極端な好熱性生物からの蛋白質として、*T. リトラリス*DNAポリメラーゼは、完全な変性の不首尾もしくは他の固有な性質のため常態でない比較分子量に電気泳動されることがあることを念頭に置くべきである。本発明の熱安定性酵素の正確な分

子量は、T. リトラリスDNAポリメラーゼ遺伝子のコーディング配列から決定することができる。溶出産物の分子量は、例えば、蛋白質分子量マーカー類を使用するSDS-ポリアクリルアミドゲル電気泳動(SDS-PAGE)によるような任意の技術により決定することができる。

【0023】ポリメラーゼ活性を、DNAアーゼ処理した、もしくは、活性化したDNA内へ、放射能でラベルしたデオキシヌクレオチド類の取り込みにより測定することが好ましく、その後、連続的に、DNA基質から取り込まれなかったデオキシヌクレオチド類を分離すると、ポリメラーゼ活性は、そのDNAを含む酸可溶性分画における放射能の量に比例する。Lehman, I.R., et al., J. Biol. Chem. (1958) 233: 163、この開示は、本明細書内に、引用文献として取り込んである。

【0024】100℃における本発明のDNAポリメラーゼの半減期は約60分である。このDNAポリメラーゼの熱安定性もしくは半減期は、ある1種類の放射能ラベルしたデオキシヌクレオチドを除く全てのアッセイ成分(バッファー、MgCl₂、デオキシヌクレオチド類、及び、活性化したDNA)の存在下において、興味の対照である温度において酵素を予めインキュベートすることにより決定する。4-180分の範囲に渡る予め決定した時間間隔において、小分画を除去し、先に記載した方法を用いてポリメラーゼ活性についてアッセイする。

【0025】そのDNAポリメラーゼの100℃における半減期は又、共通には、TritonX-100(ローム&ハース社)として知られている非イオン性洗剤オクトキシノール、もしくは、蛋白質のウシ血清アルブミン(BSA)のような安定化剤類の存在下において測定することもできる。非イオン性洗剤ポリオキシエチル化した(Tween 20)ソルビタンモノラウリン酸(Tween 20、ICI アメリカズ社)、及び、エトキシ化したアルキルフェノール(ノニル)(イコノール NP-40、BASF ワイアンドット社)を使用することもできる。安定化剤を使用して、反応混合物に対して添加する少量の酵素を、試験管の側面への吸着、あるいは、その酵素活性を低減させるある種の方法における構造的立体配座の変化から回避させる。安定化剤TritonX-100もしくはBSAの存在下における、T. リトラリスから取得可能なDNAポリメラーゼの100℃における半減期は、約95分である。

【0026】

組換えT. リトラリスDNAポリメラーゼの調製

T. リトラリスDNAポリメラーゼを又、この酵素をコードする遺伝子をT. リトラリスのゲノムDNAからクローン化した時の組換えDNA技術により産生させることもできる。T. リトラリスDNAポリメラーゼについての完全なコーディング配列を、約1.4kbのBamHI 制限

断片上のバクテリオファージNEB#619から誘導することができる。このファージは、1990年4月24日にアメリカン タイプ カルチャー コレクション(ATCC)に寄託し、受託番号ATCC40795を有する。

【0027】T. リトラリスDNAポリメラーゼの組換え型の産生は、以下に示す段階を含む：ポリメラーゼの活性型をコードするDNAを、天然型で、あるいは、他の配列との融合物としてのいずれかにおいて単離するが、後者の場合、他の配列は天然型のポリメラーゼから開裂により除去されてよいし、あるいは、そうでなくともよく、かつ、ポリメラーゼ活性に影響を与えてもよく、あるいは、与えなくてもよい。次に、この遺伝子を、原核生物もしくは真核生物宿主/ベクター系のいずれかにおいて、発現のための適切な調節配列類に遺伝子操作により結合させることができる。このベクターは、適切な宿主内における形質転換及び保持に必要な全ての機能をコードすることが好ましく、かつ、T. リトラリスポリメラーゼ発現についての選択的なマーカー類及び/又は調節配列類をコードすることができる。活性な組換え熱安定性ポリメラーゼを、連続的にもしくは発現の誘導後のいずれかに、形質転換させた宿主生物類により産生させることができる。活性な熱安定性ポリメラーゼを、宿主細胞内から、あるいは、その蛋白質が細胞膜を通して分泌される場合には培養培地から、のいずれかで回収することができる。

【0028】先の段階の各々を数々の方法において実行することができる一方、T. リトラリスDNAポリメラーゼをコードするDNAのクローニングについては、大腸菌内のそれ自身の調節配列からのポリメラーゼの発現の結果、ポリメラーゼ遺伝子の不安定性、ポリメラーゼ遺伝子の高頻度の突然変異、遅い細胞増殖、及び、幾分かの度合いの細胞死亡率を生じる。

【0029】理論には縛られたくないものの、この不安定性は、少なくとも、Fig. 6のヌクレオチド1776から3389までのものからT. リトラリスDNAポリメラーゼ遺伝子を切り離す1614bpのイントロン、及び、ヌクレオチド3534から4703までのものからT. リトラリスDNAポリメラーゼを切り離す第2の1170bpのイントロンのためであると考えられている。以下に論議するように、介在配列がやはり他の古細菌からのDNAポリメラーゼをコードするDNA中に存在すると考えられている。数々の古細菌からのイントロン類もやはり、T. リトラリスDNAポリメラーゼをコードするDNA中に存在するイントロン類に対する実質的な相同性を共有するものと考えられており、これにより、本発明のある側面に従い、それらの同定、位置決定、及び、除去が容易になる。

【0030】イントロンは、遺伝子のコーディング領域を分断する介在性DNAの広がりである(蛋白質のコー

ディング領域はエキソンと呼ばれている)。イントロンは、ナンセンス配列を含むことができるか、あるいは、蛋白質をコードすることができる。機能を有する蛋白質を作成する目的で、このイントロンは、成熟したmRNAの蛋白質への翻訳以前に、前-mRNAの外ヘスプライスされる必要がある。イントロンは、本来は、真核生物内に同定されたが、最近、特定の原核生物内において記載されている(例えば、Krainer and Maniatis (Transcription and Splicing (1988) B.D. Hames and D.M. Glover, eds. IRL Press, Oxford and Washington, D. C. pp.131 -206) を参照せよ)。イントロンを有する遺伝子がmRNAに転写される場合、そのイントロンが自己スプライシングを行い、成熟したmRNAを形成するか、あるいは、前-mRNAからそのイントロンを除去するには細胞因子が必要であることができる。同著者。細菌のイントロンは、しばしば、スプライシングに遺伝子特異的な補助因子を必要とする。例えば、あるバシラスのイントロンは、大腸菌内ではスプライシングされることができない。(同著者)。

【0031】しかしながら、T. リトリスDNAポリメラーゼをコードする遺伝子内に含まれる介在DNA配列が転写されかつ翻訳され、更に、そこから産生されるペプチドはmRNAレベルではなく蛋白質レベルでスプライシングされることを示唆するある種の証拠が存在する。従って、スプライシングが行われる場所如何によらず、大腸菌内におけるT. リトリスDNAポリメラーゼの発現の目的では、大腸菌系内におけるポリメラーゼの発現に先立ち、介在配列を削除することが好ましい。当然のことながら、例えば、あるサーモコッカス系のような、イントロンをスプライシングするための適切な因子を所有する系内においてT. リトリスDNAポリメラーゼを含む組換えベクターを発現させることができる。

【0032】又、T. リトリスの熱安定性ポリメラーゼ発現が、クローニング及び発現の最中に、大腸菌内で強固に調節されることも好ましい。本発明を実施するのに有用なベクター類は、以下に示す調節要所の幾つかもしくは全てを提供することにより、様々な度合いに調節されたT. リトリスポリメラーゼ発現を提供するはずである：(1) ポリメラーゼの出発点に直接近接しているか、あるいは、融合蛋白質類としてのいずれかの、プロモーター類もしくは転写開始部位、(2) 遺伝子発現のスイッチを入れたり切ったりするのに使用することができるオペレーター類、(3) 翻訳の改善のためのリボソーム結合部位、及び、(4) 安定性の改善のための転写もしくは翻訳停止部位。T. リトリスポリメラーゼのクローニング及び発現に使用される適切なベクターには、例えば、ファージ及びプラスミド類がある。ファージの例には、 λ gt11 (プロメガ社)、 λ Dash (ストラタジーン社)、 λ ZapII (ストラタジーン社) があ

る。プラスミド類の例には、pBR322、pBluescriptI (ストラタジーン社)、pSP73 (プロメガ社)、pGW7 (ATCC No. 40166)、pET3A (Rosenberg, et al. Gene, (1987) 56:125-135)、及び、pET11C (Methods in Enzymology (1990) 185: 60-89) がある。

【0033】形質転換及び感染

形質転換、ファージの感染、及び、細胞培養については、標準的な観察記録が存在する。Maniatis, et al., Molecular Cloning: A Laboratory Manual (1982)。プラスミドの形質転換について使用することができる多数の大腸菌株には、JM101 (ATCC No. 31343)、XL1 (ストラタジーン社)、RRI (ATCC No. 31343)、及び、BL21 (DE3) plysS (Methods in Enzymology (1990)、上述) がある。この株の中でラムダーファージについて使用することができるのは、大腸菌株XL1、ER1578、及び、ER1458 (Raleigh, et al., N.A. Research (1988) 16: 1563 -1575) であり、更に、Y1089 を、ラムダーgt11の溶原性について使用することができる。Y1089 において一時的な溶原物質を調製する場合 (Arasu, et al., Experimental Parasitology (1987) 64: 281-289)、1種類の大量のファージにより、もしくは、溶菌性宿主と共に培養することのいずれかにより、培養物をラムダーgt11の組換えファージで感染させる。この感染したY1089 細胞は、誘導物IPTGの存在下において、37℃で増殖させるのが好ましく、その結果、溶菌欠損性の宿主/ファージ系内に、組換え蛋白質を作製する。

【0034】ゲノムDNA発現ライブラリーの作製及び熱安定性ポリメラーゼのスクリーニング

特別な遺伝子のスクリーニングの最も一般的な方法は、(1) 他の生物からの相同性を有する遺伝子に対してハイブリッド形成させることによるもの、(2) 宿主の欠損の相補性による活性の選択、(3) 特異的抗体類との反応性、あるいは、(4) 酵素活性についてのスクリーニング、である。T. リトリスについては抗体の検出が好ましく、それは、その方法は本来、完全に活性な酵素ではなく酵素の一部分の発現のみを必要とするためである。大腸菌内でのT. リトリスポリメラーゼ遺伝子の不安定性が、他の方法による成功することをより困難なものにしてしまっている。

【0035】T. リトリスのDNAを、ランダムな断片としてか、あるいは、制限酵素断片としてのいずれかで、ゲノムライブラリーを作製するのに用いることができる。後者の方法が好ましい。EcoRI部分を、T. リトリスのゲノムDNAから、Maniatis et al., Molecular Cloning: A Laboratory Manual (1982) に記載してあるような標準的なDNA制限技術、この開示は本明細書内に引用文献として取り込んである、を使用して調製することが好ましい。BamHI、NruI、及び、XbaIのような他の制限酵素を使用することもできる。

【0036】複数の方法を、抗体を使用してプラスミド類及びファージの両方をスクリーニングするのに利用することができるものの (Young and Davis、PNAS、(1983) 80: 1194 - 1198)、本発明に従い、ファージ系がより良く作用する傾向にあり、かつ、そのため、最初のライブラリに好ましいということを発見した。T. リトリスの調節領域が大腸菌内において機能しているかどうかが不確実であるため、ラムダー-gt11及びラムダー-Zapllcのような全ての必要な発現調節領域を供給するファージベクターが好ましい。T. リトリスDNAの、ラムダー-gt11のEco RI部以内へのクローニングにより、T. リトリスポリメラーゼを、ベクター-ガラクトシダーゼとの融合蛋白質として、あるいは、それ自身の内因性プロモーター類から、のいずれかで、発現させることができる。

【0037】一度形成すれば、この発現ライブラリーを、マウスの抗-T. リトリスDNAポリメラーゼ抗体で、Young and Davis、PNAS (1983)、により記載されているもののような、標準的な抗体/ブランク法を使用してスクリーニングする。

【0038】発現ライブラリーをスクリーニングするために使用される、マウスの抗-T. リトリスDNAポリメラーゼ抗体は、Harlow and Cane、Antibodies: A Laboratory Manual (1988) CSH Press、において記載されている技術、この開示は引用文献として本明細書内に取り込んである、のような、標準的な技術を使用して調製することができる。大半の血清が大腸菌の蛋白質と反応するため、発現ライブラリーをスクリーニングする場合、T. リトリスポリメラーゼ抗血清を標準的な方法により大腸菌の蛋白質に対して予め吸着させて、バックグラウンドの反応性を低減させることが好ましい。抗-T. リトリスポリメラーゼ抗体と反応するファージを選択し、ブランク精製する。Young and Davis、PNAS (1983)、上述。

【0039】その後、一部分もしくは完全な遺伝子をコードする、T. リトリスDNAポリメラーゼDNAを、例えば、pBR322、pBluescript、M13、もしくは、pUC19においてサブクローニングすることができる。希望であれば、このDNA配列を、例えば、サンジャーのジデオキシ鎖末端配列決定法 (Sanger, F., Nicklen, S. & Coulson, A.R. PNAS (1977) 74: 5463 - 5467) により決定することができる。

【0040】T. リトリスDNAポリメラーゼをコードするDNAの同定及びT. リトリスDNAポリメラーゼの発現

T. リトリスDNAポリメラーゼをコードするDNA配列が取得されたことを決定するためには数々の方法が存在する。これらは、例えば、天然の蛋白質に対して組換えDNAにより産生された蛋白質の実際もしくは演繹したアミノ末端配列を比較すること、あるいは、その

組換えDNAが、天然のT. リトリスDNAポリメラーゼに特異的な抗体に結合する蛋白質を産生しているかどうかを決定することを含む。更に、Wang, et al., FASEB Journal (1989) 3: 20、は、DNAポリメラーゼ配列の特定の領域が、多くの種間において高度に保存されていることを示唆している。結果としては、クローン化した遺伝子産物の予想されるアミノ酸配列を、ヒトのDNAポリメラーゼ及び大腸菌ファージT4 DNAポリメラーゼのような既知のDNAポリメラーゼのアミノ酸配列と比較することによって、散在するこれらの相同性配列を同定すれば、この組換えDNAが実際にDNAポリメラーゼをコードしていることの強い証拠が得られる。一度同定しさえすれば、T. リトリスDNAポリメラーゼをコードするDNA配列を、例えば、pET3A、pBluescript、あるいは、pUC19のような大腸菌に由来するプラスミド、pUB110、pTP5、及び、pC194のようなバチルス・スプテリス (*Bacillus subtilis*) に由来するプラスミド類、pSH19、及び、pSH15のようなイースツに由来するプラスミド類、ラムダーファージのようなバクテリオファージ、アグロバクテリウム・ツメファキエンス (*Agrobacterium tumefaciens*) のような細菌、レトロウイルスのような動物性ウイルス類、及び、バクテリオウイルスのような昆虫ウイルス類、のような適切な発現ベクター内へクローン化することができる。

【0041】先に記載したように、本発明に従い、T. リトリスDNAポリメラーゼをコードするDNAは、以下に示す2つのイントロンを含むことが発見された：i) Fig. 6において、ヌクレオチド1776から3389へ広がる、1614bpのイントロンもしくは介在配列、及び、ii) Fig. 6において、ヌクレオチド3534から4703に広がる、1170bpのもの。この1170bpのイントロンはエンドヌクレアーゼをコードしており、かつ、大腸菌内で自己スプライシングすることが発見されている。大腸菌のような宿主細胞内における過剰発現に先立ち、1614及び1170bpのイントロンの両方をコードするDNA配列を除去することが好ましい。たとえ、この1170bpのイントロンが大腸菌内でスプライシングされるとしても、このイントロンを含まない発現ベクターは、結果として、希望するポリメラーゼの産生を増大することが発見されている。

【0042】一般的に、一度イントロンを同定し、更に、ヌクレオチド配列における位置決定を行ったら、DNA配列を除去するため、つまり、イントロンをインビトロにおいてスプライシングさせるために使用することができる、当業者にしられている数々の方法が存在する。ある方法は、スプライシングの接合点もしくは除去されるべき領域付近に存在するコーディング領域における非反復の制限酵素部位を同定することを必要とする。二重らせんオリゴマーを合成して、2つの制限断片の間隙を橋渡しさせる。アミノ末端制限断片、橋渡しし

ているオリゴ及びカルボキシ末端制限断片からなる三点結合連鎖反応により、イントロンを除去した完全な遺伝子が生産される。

【0043】他の方法は先に記載した方法の改良法である。過半数のイントロンを、イントロン内に含まれる非反復部位と共に、コーディング配列の境界に近くで制限酵素で切断することにより除去する。過半数のイントロンが除去された直線のプラスミドを互いに結合させる。1本鎖のファージを、pBluescript ベクターの組換え体から、f1ヘルパーファージIRI との重感染により作製する。希望する最終配列を有する1本鎖のオリゴマーを合成し、更に、部分的にイントロンを除去したファージDNAに対してアニールする。残りのイントロンをこのようにループ状にして追い出す。大腸菌株CJ236内でもともとファージを産生させることにより、突然変異誘発のKunkel法、Methods in Enzymology 154:367 (1987) を使用して、完全にイントロンが除去された作製物類を選択することができる。

【0044】イントロンを除去するのに用いることができる更に他の方法は、DNA増幅を使用する。例えば、Maniatis, et al., Molecular Cloning: A Laboratory Manual, (1989) Vol. 2, 2nd edition, この開示は引用文献として本明細書内に取り込んである、を参照せよ。簡潔に言うと、プライマーを作製して、遺伝子のアミノ及びカルボキシル半部分を増幅させ、その後、つなぎ合わせる。

【0045】先に論議した方法を使用してイントロンをインビトロにおいて除去する場合、天然のスプライス結合点は未知であってよい。従って、当業者は、活性酵素の産生を結果として生じる数々の人工的スプライス結合点が存在し得ることが予測できる。

【0046】一度イントロンを除去すれば、T. リトラリスの過剰発現を、例えば、T. リトラリスDNAポリメラーゼをその内因性調節成分から分離し、更にその後、T7発現ベクターのような非常に強固に調節されるプロモーターに対してこのポリメラーゼ遺伝子を遺伝子操作を利用してつなぎ合わせるにより実行することができる。本明細書内に引用文献として取り込んである、Rosenberg, et al., Gene (1987) 56:125-135, を参照せよ。強力なプロモーターの挿入は、T. リトラリスDNAポリメラーゼ遺伝子の両端付近の都合の良い制限標的、及び、プロモーター付近のベクターにおける和合性の制限標的を同定するか、あるいは、部位特異的突然変異誘発 (Kunkel (1984)、上述) を使用して制限標的を作製し、更に、強力なプロモーターの転写及び翻訳調節下におけるもののような向きで、ベクター内にこのT. リトラリスDNAポリメラーゼ遺伝子を転移させることにより行うことができる。

【0047】T. リトラリスDNAポリメラーゼをやはり、T. リトラリスDNAポリメラーゼ遺伝子の上流に

位置する強力な結合部位を利用することにより過剰発現させて、その遺伝子の発現を増大させることもできる。本明細書中に引用文献として取り込んである、Shine and Dalgarno, Proc. Natl. Acad. Sci. USA (1974) 71: 1342-1346を参照せよ。

【0048】この組換えベクターを、形質転換及びファージ感染のための標準的な技術を使用して、適切な宿主内へ導入する。例えば、Cohen, S.N., PNAS (1972) 69: 2110, この開示は引用文献として取り込んである、により記載されているように、塩化カルシウム法が大腸菌のために使用されている。バシルスの形質転換は、Chang, S., et al., Molecular and General Genetics (1979) 168: 111, この開示は引用文献として取り込んである、に従って行う。イーストの形質転換は、Parent, et al., Yeast (1985) 1: 83-138, この開示は引用文献として取り込んである、に従って行う。特定の植物性細胞類は、Shaw, C.H., et al., Gene (1983) 23: 315, この開示は引用文献として取り込んである、に記載されている方法に従って、アグロバクテリウム・ツメファキエンス (Agrobacterium tumefaciens) で形質転換させることができる。動物性細胞類の形質転換は、例えば、Virology (1973) 52: 456, この開示は引用文献として取り込んである、に記載されている方法に従って行う。昆虫細胞類の形質転換は、例えば、Biotechnology (1988) 6: 47, この開示は本明細書中に引用文献として取り込んである、において記載されている方法に従って行う。

【0049】形質転換体を、使用する宿主細胞によって、このような細胞に適する標準的な技術を使用して培養する。例えば、大腸菌の培養については、細胞を、LB培地 (Maniatis, 上述) 中で、30℃から42℃で、中間log もしくは定常相にまで増殖させる。

【0050】このT. リトラリスDNAポリメラーゼを、形質転換した細胞類の培養物から、例えば、培養した細胞類もしくは培養溶液からのいずれかからの抽出により単離及び精製することができる。

【0051】T. リトラリスDNAポリメラーゼを培養した細胞から抽出する場合、この細胞を、培養後、例えば遠心のような当業者に知られている方法により回収する。その後、回収した細胞を適切なバッファー溶液に懸濁し、超音波処理、リゾチーム、及び/又は、凍結融解により破壊する。T. リトラリスDNAポリメラーゼを含む未精製抽出物は、遠心、及び/又は、濾過により取得する。

【0052】T. リトラリスDNAポリメラーゼが培養溶液中に、つまり、単独であるいはマルトース結合性蛋白質のような分泌性蛋白質との融合蛋白質として分泌される場合には、上清を当業者に知られている方法により細胞から分離する。

【0053】培養上清もしくは細胞抽出物中に含まれる

T. リトリスDNAポリメラーゼの分離及び精製は、先に記載した方法、あるいは、既知の分離及び精製法の適切な組み合わせにより行うことができる。これらの方法には、例えば、塩析法及び溶媒沈殿法のような溶解度を利用する方法、透析法、限界濾過法、ゲル濾過法、及び、SDS-ポリアクリルアミドゲル電気泳動法のような分子量の違いを利用する方法、イオン交換カラムクロマトグラフィーのような電子荷電における違いを利用する方法、親和性クロマトグラフィーのような特異的親和性を利用する方法、逆相高速液体クロマトグラフィーのような疎水性における違いを利用する方法、及び、等電点電気泳動法のような等電点における違いを利用する方法がある。

【0054】この組換え酵素の単離及び精製に好ましいある方法は、域下に示すような多段階過程を使用して行う。

【0055】最初に、細胞を、凍結してあれば解凍して、バッファーA（100mMのNaCl、25mMのトリス pH7.5、0.1mMのEDTA、10%のグリセロール、0.05%のTritonX-100）のような適切なバッファー中に懸濁させ、溶菌及び遠心する。澄清化した未精製抽出物を、その後約30分間、75℃に加熱する。変成した蛋白質類を遠心により除去する。この上清を、その後、アフィゲル ブルー カラム（バイオラッド社）のような、核酸に結合する蛋白質類について高い親和性を有するカラムを通す。上清溶液中に存在する核酸及び多くの蛋白質類がカラムを通過し、そのため、これらを、pHが約7.0である低塩バッファーをカラム容積の数倍容量を用いてカラムを洗浄することにより除去する。洗浄後、0.1Mから1.5MのNaClバッファーAのような直線濃度勾配液で酵素を溶出する。活性分画を一まとめにし、透析し、更に、フォスフォセルロースカラムに供する。このカラムを洗浄し、DNAポリメラーゼ活性を、バッファーB（100MのNaCl、15mMのKPO₄、0.1mMのEDTA、10%のグリセロール、0.05%のTritonX-100、pH6.8）中に含まれる0.1から1.0MのNaClの直線濃度勾配液で溶出する。複数の分画を回収し、更に、各分画にBSAを添加する。DNAポリメラーゼ活性を有する分画を一まとめにする。取得されるT. リトリスDNAポリメラーゼを、先に論議した標準的な産物精製技術を使用して更に精製することができる。

【0056】

T. リトリスDNAポリメラーゼの安定化及び用途
長期保存のために、本発明の熱安定性酵素を以下に示すバッファー中で保存する：-20℃における、0.05MのNaCl、0.01MのKPO₄（pH7.4）、0.1mMのEDTA、及び、50%のグリセロール。

【0057】本発明のT. リトリスDNAポリメラーゼを、このような酵素が必要であるかあるいは希望され

るような任意の目的に使用することができる。例えば、cDNAのクローニングにおける第2鎖のcDNA合成を含む組換えDNA技術、及び、DNA配列決定である。Maniatis, et al., 上述。

【0058】本発明のT. リトリスDNAポリメラーゼを化学的もしくは遺伝子的に修飾して3'-5'エキソヌクレアーゼ機能を不活性化させることができ、かつ、例えば、DNA配列決定のように、そのような、修飾した酵素が希望される任意の目的に使用することができる。

【0059】例えば、遺伝的に修飾したT. リトリスDNAポリメラーゼを、T. リトリスDNAポリメラーゼ遺伝子をランダムに突然変異誘発させ、その後、ポリメラーゼ活性を消失せずにエキソヌクレアーゼ活性を消失したこれらの突然変異体をスクリーニングすることにより単離することができる。それに代わる方法としては、遺伝的に修飾したT. リトリスDNAポリメラーゼを、Kunkel, T.A., PNAS (1985) 82: 488-492、この開示は本明細書中に引用文献として取り込んでいる、において記載されている部位特異的突然変異誘発を使用することにより単離することが好ましい。

【0060】更に、本発明のT. リトリスDNAポリメラーゼを、やはり、例えば、米国特許番号4,683,195、4,683,202、及び、4,800,159において開示されている方法により、DNAを増幅させるのに使用することもできる。

【0061】ゲノムDNAライブラリーの作製及びT. リトリス以外の古細菌からの熱安定性ポリメラーゼのスクリーニング

本発明に従い、T. リトリスのDNAポリメラーゼ遺伝子から調製したDNAプローブ、及び/又は、マウスの抗-T. リトリス抗血清との交差反応性を利用する、標的古細菌ゲノムDNAライブラリーのクロスハイブリッド形成は、メサノコッカス（*Methanococcus*）、メサノバクテル（*Methanobacter*）、メサノミクロビウム（*Methanomicrobium*）、ハロバクテル（*Halobacter*）、セルモプラズマ（*Thermoplasma*）、セルモコッカス（*Thermococcus*）、ピロコッカス（*Pyrococcus*）、及び、その類のもの（例えば、Woese, C., Microbiological Reviews, pp. 221-270, June 1987、この開示は本明細書中に引用文献として取り込んでいる、を参照せよ）のような他の古細菌からのDNAポリメラーゼ遺伝子の同定及び単離を考慮に入れている。

【0062】一般的に、他の古細菌からのDNAは、先に記載した方法を使用して単離することができる。T. リトリスと同様、一度単離したこの古細菌のDNAも、ランダムな断片としてか、あるいは、制限酵素断片としてのいずれかで、ゲノムライブラリーを作製するのに使用することができる。後者の方法が好ましい。この方法は、一般的に、多様な制限酵素類で標的ゲノムDN

Aを切断し、かつ、例えば、T. リトラリスDNAプローブを用いて、そのように形成される断片を探索することを含む。その後、ライブラリーを、単一のハイブリッド形成を産生し、かつ、標的のDNAポリメラーゼの分子量を少なくともコードするのに充分な、約4 Kbもしくはそれを上回る大きさである、1種類もしくは複数の酵素から形成する。

【0063】複数の方法を、抗体類もしくはDNAプローブ類を使用するプラスミド類及びファージの両方をスクリーニングするのに使用することができるものの (Young and Davis, PNAS (1983) 80: 1194-1198; Maniatis et al., 上述)、本発明に従い、ファージ系が良く作用する傾向にあり、かつ、そのため、最初のライブラリーに好ましいことを発見した。

【0064】コロニーもしくはブランクハイブリッド形成法 (Maniatis, et al., 上述) を使用して、あるいは、抗体ブランクDNA法を使用して、ゲノムライブラリーをスクリーニングすることができる。コロニーもしくはブランクハイブリッド形成法においては、DNAプローブを、例えば、T. リトラリスのような関連する生物からのポリメラーゼ遺伝子をラベル化することにより形成することができる。このゲノムライブラリーを、以下に記載されているような各場合において実験的に決定することができる希望する緊縮度による条件化において、ラベル化されたプローブとハイブリッド形成させる。

【0065】具体的には、各古細菌は、標的DNAの検出度を最大限にする目的で、それ特有の一連のハイブリッド形成条件を必要とするものの、数々の基本的方法に従うことができる。至適ハイブリッド形成条件及びプローブは、例えば、多様な温度において試験的なサザンブロットングを行うことにより、各標的古細菌について決定することができる。ハイブリッド形成は、典型的には、4×SET、0.1Mのリン酸ナトリウム、pH7.0、0.1%のNaピロリン酸、0.1%のSDS、1×デンハルズ溶液 (Maniatis, 上述) 中で行う。プローブの選択も、T. リトラリスDNAポリメラーゼ遺伝子のサイズ及び領域に関連して変えることができる (Fig. 6)。至適プローブは、大きいもしくは小さいDNA断片、あるいは、オリゴマー類さえ用いて、先に記載したように、試験的なサザンブロットングを行うことにより、標的古細菌について決定することができる。例えば、T. リトラリスの介在配列の一つの中に完全に含まれるプローブを選択して、標的古細菌のDNAポリメラーゼ遺伝子内における介在配列をスクリーニングすることができるか、そうでなければ、このようなプローブは、成熟したポリメラーゼコーディング領域に限定されることがある。

【0066】一般的には、このDNAプローブは、Fig. 6の完全な配列であるか、あるいは、その一部分であ

る。このDNAプローブは、少なくとも20ヌクレオチド分の長さであるべきであり、少なくとも約50ヌクレオチド分の長さであることが好ましく、少なくとも約150ヌクレオチド分の長さであることが最も好ましい。使用することができる3種類のこのようなDNAプローブは、1. 3kb断片 (Fig. 6のヌクレオチド1から1274)、1. 6kb断片 (Fig. 6のヌクレオチド1269から2856)、及び、1. 9kb断片 (Fig. 6のヌクレオチド2851から4771) である。

【0067】T. リトラリス同様、標的古細菌のDNAポリメラーゼをコードするDNAを、やはり、抗体/ブランク法を使用して取得することもできる。抗体/ブランク法を使用してゲノム発現ライブラリーをスクリーニングする場合、この標的古細菌の調節領域が果たして大腸菌内で機能するかどうか未確定であるため、λgt11及びλZapIIのような、全ての必要な発現調節領域を供給するファージベクター類が抗体スクリーニングには好ましい。古細菌DNAをλgt11のEcoRI部位のような適切な部位内へクローン化することにより、λgt11及びλZapII内におけるベクター-ガラクトシダーゼとの融合蛋白質として、あるいは、それ自身の内因性プロモーターからのいずれかで、古細菌のDNAポリメラーゼを発現させることができる。

【0068】一度形成すれば、標的古細菌からの坑-古細菌DNAポリメラーゼ抗血清で、あるいは、密接に関連している生物のDNAポリメラーゼに対する抗体により (つまり、T. リトラリス、他の極度な好熱性生物) Young and David, PNAS (1983)、上述、により記載されているもののような標準的な抗体/ブランク法を使用してこの発現ライブラリーをスクリーニングすることができる。

【0069】いずれかの方法を使用して、一部分のもしくは完全な遺伝子をコードする古細菌DNAポリメラーゼのDNAを一度同定すれば、その後、例えば、pBR32、pBluescript、M13、もしくは、pUC19内でサブクローン化することができる。希望であれば、例えば、サンジャーのジデオキシ鎖末端決定法 (Sanger, F., Nicklen, S. & Coulson, A.R. PNAS (1977) 74: 5463-5467) により決定することができる。

【0070】

DNAポリメラーゼをコードするDNAの同定

一度ゲノムDNA発現ライブラリーを作製し、かつ、古細菌のDNAをコードする標的DNAをDNAプローブもしくは抗体交差反応性の使用によりT. リトラリスから同定すれば、T. リトラリスについてのDNAポリメラーゼ配列が、T. リトラリスについて先に記載したように取得されたことを確認することができる。結果として生じるクローンを、サンジャーのジデオキシ配列決定法のような標準的な方法により配列決定することができる。

【0071】介在配列の同定、位置決定及び除去、及び、DNAポリメラーゼの過剰発現

本発明の他の側面に従い、他の古細菌からのDNAポリメラーゼをコードするDNAもやはり、1つもしくは複数の介在ヌクレオチド配列もしくはイントロンを含むことを発見した。更に、そのようなイントロンは、T. リトラリス中に発見されたイントロンと、実質的な相同性を共有するばかりでなく、それらは同一の位置に存在することを発見した。より具体的には、本発明に従って、イントロンは、T. リトラリス及びピロコッカス (Pyrococcus) 種の両方のDNAポリメラーゼの遺伝子中におけるPol α 保存領域モチーフ内に同定されている。理論に縛られたくはないのであるが、他の古細菌もやはり、それらのDNAポリメラーゼについて、コーディング領域内に1つもしくは複数の介在配列を所有すると考えられている。これらのイントロンを、2つの方法において同定することができる。そのイントロンが、T. リトラリス及び／又はピロコッカス sp. のDNAポリメラーゼ遺伝子内に位置するイントロンに関連する場合には、T. リトラリスもしくはピロコッカス sp. のDNAポリメラーゼ遺伝子のイントロン配列に由来するDNAプローブに対する低緊縮度ハイブリッド形成によりそれらを同定することができる。2番目には、先に記載したように、一度、古細菌のDNAポリメラーゼ遺伝子を同定及び単離してあれば、そのDNAポリメラーゼ遺伝子をDNAレベルで配列決定することができ、更に、その配列を、(1) 非類似性断片を同定するために、他のDNAポリメラーゼと、あるいは、(2) 1つもしくは複数の領域I-VIが存在していないことを探索するために、保存されているモチーフと、比較し、次には、存在していない領域における分断位置の同定を行う。

【0072】一度同定すれば、例えば、先に記載した技術、及び、T. リトラリスDNAポリメラーゼ遺伝子内における2つのイントロンを除去するための実施例における技術により、そのイントロンをインビトロにおいて除去することができる。

【0073】以下に示す実施例は、現在実行することが好ましいという理由のため、本発明の実施態様を説明するために与える。この実施例は説明的なものであり、かつ、本発明は、添付した特許請求の範囲に示すものを除き、制限として考慮されるべきものではないことを理解していただきたい。

【0074】実施例1

セルモコッカス・リトラリスからの熱安定性DNAポリメラーゼの精製

T. リトラリス株NS-C (DMS No. 5473) を、1000リットルの発酵機内において、10g/lの基本的なイオウを含む、Belkin, et al., 上述、により記載されている培地中で、約80℃の最高耐久可能温度で2日間増殖した。この細胞を室温に冷却し、デカンテーション

することにより未使用のイオウから分離し、更に、遠心により回収し、更に、-70℃に保存した。細胞の回収率は、リットル当たり0.8gであった。

【0075】先に記載したように取得した細胞の183gを、0.1MのNaClを含む550mlのバッファーA (10mMのKPO₄ バッファー、pH7.4; 1.0mMのEDTA、1.0mMのベーター-メルカプトエタノール) 中に懸濁し、更に、4℃において5分間超音波処理した。この溶菌液を、4℃において30分間、15,000gで遠心した。この上清溶液を、470mlのアフィゲル ブルー カラム (バイオラド社) を通した。その後、カラムを、0.1MのNaClを含む1000mlのバッファーAで洗浄した。このカラムを、バッファーA中に含まれる0.1から2.0MのNaClの2000mlの直線濃度勾配液で溶出した。DNAポリメラーゼは、約1.3MのNaClにおいて単一のピークとして溶出され、カラムに供した活性の80%を示した。DNAポリメラーゼのピーク活性を、4リットルのバッファーAに対して透析し、その後、0.1MのNaClを含むバッファーAで平衡化した80mlのフォスフォセルロースに供した。このカラムを0.1MのNaClを含むバッファーAで洗浄し、バッファーA中の0.1から1.0MのNaClの1000mlの直線濃度勾配で溶出した。活性は、0.6MのNaClにおける単一のピークとして溶出され、カラムに供した活性の74%を示した。一まとめにした活性 (150ml) を、900mlのバッファーAに対して透析し、更に、42mlのDNA-セルロースカラムに供した。このカラムを、0.1MのNaClを含むバッファーAの84mlで洗浄し、酵素活性は、0.1から1.0MのNaClのバッファーAの直線濃度勾配液で溶出した。DNAポリメラーゼ活性は、0.3MのNaClにおける単一のピークとして溶出され、カラムに供した活性の80%を示した。この活性を一まとめにした (93ml)。一まとめにした分画を、0.05MのNaClを含む2リットルのバッファーAに対して透析し、その後、1.0mlのHPLC モノ-Qカラム (ファルマシア社) に供した。DNAポリメラーゼ活性は、バッファーA中の0.05Mから1.0MのNaClの1000mlの直線濃度勾配液で溶出した。DNAポリメラーゼ活性は、0.1MのNaClにおける単一のピークとして溶出され、カラムに供した活性の16%を示した。一まとめにした分画 (3.0ml) を、バッファーAで6mlに希釈し、更に、1.0mlのHPLC モノ-Sカラム (ファルマシア社) に供し、0.05から1.0MのNaClのバッファーAでの1000mlの直線濃度勾配液で溶出した。活性は、0.19MのNaClにおける単一のピークとして溶出され、カラムに供した活性の75%を示した。

【0076】SDS-ポリアクリルアミドゲル電気泳動 (SDS-PAGE) 及び、その後の、クーマシーブル

一 (Neuhoff, et al., Electrophoresis (1988) 9: 25 5-262) より、より感度の高いコロイド染色 (ISS プロブルー) を使用する蛋白質の染色により、DNA ポリメラーゼ調製物が約50%の純度であることを決定し：それによると、2本の主要なバンドが存在し、その一つは90,000から95,000ダルトンであり、二重線が、18,000ダルトンに存在した。Fig. 1 A. 非常に小さいバンドが、約80,000から85,000ダルトンに明白に見られた。このレベルでの精製において、ポリメラーゼは、ポリメラーゼ蛋白質のmg当たり、30,000単位と50,000単位のポリメラーゼ活性の間の特異的活性を有した。別に行ったSDS-ポリアクリルアミドゲルにおいて、精製したT. リトラリスポリメラーゼを含むゲルラインを18本の薄片に切り出すことにより、90,000から95,000ダルトンにおける染色したバンドの同定の検証が得られた。カラムにのせた蛋白質を、0.1%のSDS及び100 µg/mlのBSAを含むバッファー中でそのゲル薄片を挿入することにより、ゲルから溶出させた。この溶出した蛋白質を、グアニジンHClに対して露出させることにより変成させ、その後、Hager and Burgess, Analytical Biochemistry (1980) 109:76-86により記載されているように、変成剤の希釈により復元させた。ポリメラーゼ活性は、放射能でラベルした³²P-dCTPの、酸可溶性DNA内への取り込みにより測定し (先に記載したように)、更に、エキソヌクレアーゼ活性についてアッセイした (実施例5において記載するように、³H-ラベルしたDNAの、酸可溶性型への放出により測定される)。Fig. 1 Bにおいて示すように、90,000から95,000ダルトンのバンドのみが、有意なポリメラーゼ活性もしくはエキソヌクレアーゼ活性のいずれかを示した。

【0077】このDNAポリメラーゼ調製物を、0.05MのNaClを含むバッファーAに対して透析した。SDS-PAGEにより決定したように、18,000ダルトンの蛋白質の大部分が溶液外に沈殿化した。T. リトラリスDNAポリメラーゼの回収率は、定量的蛋白質分析により0.5mgであると決定され、かつ、これは、出発未精製抽出物中に存在する総活性の6.5%を示した。

【0078】精製したT. リトラリスポリメラーゼを電気泳動し、更に、クーマシーブルー、もしくは、蛋白質を検出するための予め記載してあるコロイド染色 (ISS プロブルー) のいずれかで染色した。一つの濃く染色される蛋白質バンドが、約90,000から95,000ダルトンに見られ；以下に示すマーカー蛋白質の移動に対する同一ゲル上での比較により、この分子量決定を行った：ミオシン、200,000ダルトン；フォスフォリラーゼB、97,400ダルトン；BSA、68,000ダルトン；オバルブミン、43,000ダルトン；

カルボニックアンヒドラーゼ、29,000ダルトン；b-ラクトグロブリン、18,400ダルトン；リゾチーム、14,300ダルトン。

【0079】実施例2

T. リトラリスDNAポリメラーゼ遺伝子のクローニング

A. マウスの坑-T. リトラリスDNAポリメラーゼ抗血清の産生マウスの免疫化

0.4mgのポリメラーゼ蛋白質を含む3mlの溶液 (実施例1の方法により取得された) を、4℃において約0.3mlに濃縮し、更に、2匹のマウスを接種するのに使用した。精製したT. リトラリスポリメラーゼ調製物は、クーマシーブルーで染色したSDS-PAGE上において、約85-95、75-85、及び、10-25kDaの二重線の4本のバンドからなっていた。実施例1において示したように、T. リトラリスポリメラーゼは、約90-95kDaである。両方のT. リトラリスポリメラーゼ抗血清は、この免疫原中に存在する4種類全ての蛋白質を認識する。

【0080】免疫化スケジュールは以下に記載するとうりであった：マウス1をフロインドの完全補助剤 (FCA) 内に含まれる、先のように調製した、20 µg のT. リトラリスポリメラーゼで、腹腔内 (IP) で免疫化した。7日後、両方のマウスを、FCA内に含まれる50 µg のT. リトラリスポリメラーゼでIP (腹腔内注射) により免疫化した。27日後、両方のマウスを、フロインドの不完全補助剤内に含まれる30 µg のT. リトラリスポリメラーゼで (マウス1)、50 µg のT. リトラリスポリメラーゼで (マウス2)、IPにより免疫化した。マウス1は2週間後に脱血し、マウス2は20日後に脱血した。血清は、標準的な方法により血液から調製した (Harlow and Lane, Antibodies: A Laboratory Manual, 1988)。

【0081】坑-T. リトラリスポリメラーゼ抗血清を、1%のBSA、0.1%のNaアジド、0.1%のPMSFを含むTBSTT (20mMのトリス、pH7.5、150mMのNaCl、0.2%のTween 20、及び、0.05%のTriton-X100) 内で希釈した。

【0082】大腸菌溶菌液に対する坑-T. リトラリスポリメラーゼ抗血清の前吸着

大半の血清が大腸菌の蛋白質と反応するため、以下に示す方法を使用して、T. リトラリスポリメラーゼの抗血清を大腸菌蛋白質に対して前吸着させて、ライブラリー類もしくは組換え抗体類をスクリーニングする場合のバックグラウンドの反応性を低減した。大腸菌の細胞ペーストを解凍し、超音波処理により溶菌化させ、可溶性蛋白質を、製造元により記載されているとうりに、アフィゲル10 (パイオラド社) に結合させた。4mlの大腸菌樹脂をTBS (洗剤を含まないTBSTT) で2回洗浄

した。0.35mlの血清を、TBSTT、1%のBSA、0.1%のNaアジド中で約1から5倍に希釈し、更に、樹脂と、4℃で一晩混合させた。この樹脂を遠心によりペレット状にし、更に、洗浄した。回収された前吸着血清は1から17倍希釈物であり、使用するまで-20℃で凍結して保存した。

【0083】スクリーニングのためには、前吸着させた血清を、先のように、1:200の最終濃度に希釈した。

【0084】B. T. リトリスポリメラーゼ遺伝子についてのプローブの同定ラムダーgt11発現ライブラリーの作製

T. リトリスポリメラーゼ遺伝子のためのプローブは、ラムダーgt11発現ライブラリーの免疫学的なスクリーニングに従って取得した。

【0085】T. リトリスDNAを、以下に示すように部分的に消化した：4μgのT. リトリスDNAを、Eco RIバッファー（Eco RIバッファー=50mMのNaCl、100mMのトリス、pH7.5、20mMのMgCl₂、10mMのBME）を用いる40μlの反応液中で、5単位のEco RIで、37℃において消化した。3μlの100mMEDTAを、30、45、及び、60分に、15μlの試料に対して添加した。2μgのT. リトリスDNAを、Eco RIバッファーを用いる20μlの反応液中で、20単位のEco RIを用いて、37℃で90分間消化し、2μlの100mMEDTAの添加により反応を停止した。0.2μgの各消化物をアガロースゲル上で電気泳動して消化の度合いを記録した。約3μgのT. リトリスDNAのEco RI部分消化物（60分消化物からの14μl、及び、90分消化物からの19μl）を一まとめにして、「Eco RIプール」を形成し、65℃で15分間加熱した。

【0086】0.5μlのEco RIプールを、標準的な連結バッファー（連結バッファー=66mMのトリス、pH7.5、1mMのATP、1mMのスペルミジン、10mMのMgCl₂、15mMのDTT、及び、2mg/mlのゼラチン）及び0.5μlのT4DNAリガーゼ（ニューイングランド バイオラボ社、No. 202）を用いる5μlの反応液中においてEco RIで切断し、細菌のアルカリフォスファターゼで処理した0.28gのラムダーgt11のDNAに連結させた。この連結反応は、16℃で一晩行った。4μlのこの連結反応物は、製造元の解説書に従い、ギガバック ゴールド（ストラタジーン社）を使用して封入した。室温における2時間のインキュベーションの後、封入したファージを3滴のクロロフォルムを追加した500μlのSM（SM=100mMのNaCl、8mMのMgSO₄、50mMのトリス、pH7.5、0.01%のゼラチン）中で希釈した。封入したEco RIライブラリーを試料V6-1と呼び、これは、1.1×10⁵の特有なファージからなるものであった。大腸菌

株ER1578をファージ感染のために使用した。

【0087】ラムダーgt11発現ライブラリーの免疫学的なスクリーニング

最初のファージライブラリーは、先に産生された抗血清の1:200の希釈物を用いてスクリーニングした（Yong, R.A. and R.W. Davis, Science, (1983) 22: 778-782）。抗-T. リトリスDNAポリメラーゼ抗血清と反応する36種類のファージ（V10-2からV10-55）を封入し、更に、16種類のファージを精製した。

【0088】この16種類の抗体陽性なファージを使用して、大腸菌K-12株Y1089を溶原菌化させた。溶原菌を熱安定性のDNAポリメラーゼ活性についてスクリーニングしたが、活性は検出されなかった。

【0089】これらの16種類の溶原菌からのウェスタンブロット（Towbin, et al., PNAS, (1979) 76:4350-4354）を、抗-T. リトリスポリメラーゼ抗血清で試験してみた。T. リトリスポリメラーゼ抗血清と反応するこれらの溶原菌からの全ての蛋白質は、T. リトリスポリメラーゼより小さく、かつ、やはりベクターガラクトシダーゼより小さく、いずれもベクターガラクトシダーゼとの融合蛋白質ではないことが示された。

【0090】16種類の抗体陽性ファージのうちの8種類のものを使用して、全抗血清からエピトープ特異的抗体を親和性を利用して精製した（Beall and Mitchell, J. Immunological Methods, (1986) 86: 217-223）。

【0091】親和性を利用して精製した8種類の抗体陽性ファージを使用して、精製したT. リトリスポリメラーゼとT. リトリスの未精製溶菌液の両方のウェスタンブロットを試験してみた。NEB618ブランクから精製した抗体が、精製したT. リトリスポリメラーゼ及びT. リトリスの未精製溶菌液と特異的に反応した。これは、ファージNEB618が、T. リトリスポリメラーゼの約38kDaのアミノ末端をコードしていることの強い証拠であった。

【0092】ファージNEB618の性質決定及びEco RI挿入断片のサブクローニング

ウェスタンブロット分析は、ファージNEB618が、T. リトリスポリメラーゼ抗血清に結合する約15-40kDaのサイズの範囲にわたる数種のペプチドを合成することを示した。ファージNEB618からのDNAを、標準的な方法により液体培養物から精製した（Maniatis, et al., 上述）。NEB618DNAのEco RIでの消化により、1.3及び1.7kbの断片が生じた。NEB618DNAのEco RI消化物を、Eco RIで切断したpBluescriptのDNAに連結させた。20μlのpBluescriptSK+を、40μlのEco RIバッファー中で、40単位のEco RIを用いて、37℃で3時間、その後、65

℃で15分間消化した。10 μ g のNEB 618 DNAを、40 μ l のEco RIバッファー中で、40単位のEco RIを用いて、37℃で75分間、その後、65℃で15分間消化した。EcoRIで切断した1.75 μ g のNEB 618 DNAを、10 μ l の連結バッファー中で、1 μ l のT4 DNAリガーゼ（ニューイングランド バイオラボズ社、No. 202）を用いて、Eco RIで切断した20 ngのpBluescriptSK +に連結させた。この連結反応を、16℃において一晩行なった。JM101 CaCl感応細胞（Maniatis, et al. 上述）を5 μ l の結合連鎖反応混合物で形質転換させた。調査した24種類の組み換え体のうち、一つを除く全てのものが1.7 kbの断片を含んでおり；クローンV27-5.4が1.3 kbのT. リトラリスのDNA断片を含んでいた。

【0093】T. リトラリスポリメラーゼのマウス抗血清からの抗体を、先に記載したように、V27-5.4（1.3 kbのEco RI断片をコードする）及びV27-5.7（pBluescript 中において1.7 kbのEco RI断片をコードする）からの溶菌液について親和性を利用して精製し、更に、精製したあるいは未精製のT. リトラリスポリメラーゼのいずれかを含むウエスタンブロット細片と反応させた。V27-5.4の溶菌液について選択した抗体は、未精製及び精製した調製物の両方におけるT. リトラリスポリメラーゼと反応した。更に、天然のT. リトラリスポリメラーゼのN-末端蛋白質配列からの最初の3つのアミノ酸（メチオニン-イソロイシン-ロイシン）は、V27-5.4クローンにおける、予想される読み取り枠（ORF）におけるものと同様である。

【0094】これらの結果から、V27-5.4は、T. リトラリスポリメラーゼのアミノ末端をコードすることが結論付けられた。

【0095】V27-5.4の1.3 kbのEco RI断片は、Fig. 6のヌクレオチド1から1274を含む。挿入DNAは、完全なT. リトラリスポリメラーゼではないが、このクローンにより合成される最も大きいペプチドをコードするほど充分大きいものであった。

【0096】C. T. リトラリスの2番目のライブラリーの作製及びスクリーニング

先に記載した抗体スクリーニングにより、T. リトラリスポリメラーゼのアミノ末端半部分をコードしているDNA断片を同定した。全体の遺伝子をコードするほど充分長い断片を発見する目的で、T. リトラリスDNAの制限消化を、クローンV27-5.4内に含まれるポリメラーゼ遺伝子のアミノ末端半部分を用いて探索した。制限消化は、別々の試験管内で、39 μ l の制限酵素バッファー（REB、制限酵素バッファー=50 mMのNaCl、10 mMのトリス、pH7.5、20 mMのMgCl₂、10 mMのBME）中に含まれる1.2 μ g のT. リトラリスDNAを含むマスター混合物を使用して、その

試験管に以下に記載する1.5-200 Uの酵素を添加して行った：1.5 U AvrII、9 U EaeI、10 U NheI、20 U NotI、9 U SpeI、20 U XhoI、30 U XbaI、20 U SacI、10 U BamHI、20 U ClaI、20 U HindIII、20 U PstI、12 U NaeI、10 U ScaI、12 U XmnI、20 U EcoRV、20 U SalI、20 U EcoRI、200 U EagI、20 U DraI、5 U HapI、8 U NruI、4 U SnaBI、8 U StuI、10 U BclI、8 U BglII、10 U RsaI、10 U HaeIII、8 U AluI、4 U HincII、10 U PvuII、6 U SspI。

【0097】1 μ l の10 mg/ml BSAをHincII消化物に添加した。バッファー中に0 mMのNaClが存在することを除いては先のとうりにBclII消化物を調製した。50℃においてインキュベートしたBclIIを除いては、全ての消化物を37℃で一晩インキュベートした。消化物をアガロースゲル上で電気泳動し、更に、NCに転移させた（Southern, J. Mol. Biol. (1975) 98: 503-517）。このフィルターを放射能ラベルしたV27-5.4のDNAで探索し、更に、ハイブリッド形成をオートラジオグラフィーにより検出した。BamHI（約1.4 kb）、EcoRI（約1.3 kb）、HindIII（約2.4、5.4 kb）、XbaI（約8 kb）、ClaI（約4.4、5.5 kb）、BclI（約8.5 kb）、HincII（約2.1、約2.4 kb）、NruI（約5.5 kb）、BglII（約2.9 kb）、HaeIII（約1.3、約1.4 kb）、及び、多数の小さいバンドを生じるRsaIを除く大半の消化物においては、V27-5.4のDNAは、20 kbより大きい断片に対してハイブリッド形成した。

【0098】完全なポリメラーゼ遺伝子を充分コードできるほど大きい単一の断片を産生し、天然の蛋白質のサイズに基づき、2.4-3 kbであると推定される消化物はBamHI、XbaI、及び、NruIであった。

【0099】BamHI ライブラリー

ラムダーDashIIを使用してBamHI のゲノムライブラリーを作製した。ラムダーDashIIは、10-20 kbのBamHI DNA断片をクローン化するのに使用することができるBamHI 置換ベクターである。先に記載したように、BamHI で消化した25-75 ナノグラムのT. リトラリスゲノムDNAを、BamHI で消化し、ウシの腸のフォスファターゼで処理した0.5 μ g のラムダーDashIIのDNAに対して、0.5 μ l のT4 DNAリガーゼ（ニューイングランド バイオラボズ社、No. 202）を含む標準的な連結バッファー中で結合させた。3 μ l の連結反応物を先に記載したように封入した（ギガバック プラス、ストラタジーン社）。ラムダーDashIIライブラリーからの8,000 プラークのプラークリフトをラベル化したゲルで探索し、クローンV27-5.4から1.3 kbのEco RI断片を精製した（Maniatis, et al., 上述）。2.5%のファージは、1.3 kbのEco RIのDN

A断片に対してハイブリッド形成し、そのうちの2つをブランク精製した(クローン ラムダーNEB 619及びラムダーV56-9)。両方のファージとも、1.3 kbのEcoRI断片に対してハイブリッド形成する12-15 kbのBamHI断片を含み、かつ、約8 kbのXbaI及び約5.5 kbのNruI断片を含んでいた。このBamHI挿入断片をpBR322内にサブクローン化した。この断片を含むコロニー類は増殖が非常に悪く、かつ、先に記載したポリメラーゼアッセイに基づく、検出可能レベルの熱安定性DNAポリメラーゼを産生していなかった。

【0100】XbaIライブラリー

XbaIで消化したT. リトラリスのDNAを、pUC19のXbaI部位にクローン化した。コロニーリフトを放射能ラベルしたV27-5.4のDNAで探索した。陽性のクローンは検出されなかった。

【0101】ラムダーNEB 619内のBamHI挿入断片からのXbaI断片(先のBamHIライブラリー)を、pUC19のXbaI部位内へサブクローン化した。BamHIで消化した約0.3 µgのNEB 619のDNAを、20 µlの標準連結バッファー内において2 µlのT4 DNAリガーゼ(ニューイングランド バイオラボズ社 No.202)を使用してBamHIで消化した0.1 µgのpUC19 DNAに結合した。この連結物を16℃で一晩インキュベートした。CaCl₂感応細胞であるJM101及びXL-1細胞を5 µlの連結物混合物で形質転換させ、更に、37℃で一晩インキュベートした(Maniatis, et al., 上述)。コロニーリフトを、V27-5.4のDNAからの、精製して放射能ラベルした1.3 kbのEcoRI断片で探索した。陽性物は検出されなかった。感応細胞RRIを、10 µlの結合連鎖反応混合物で形質転換させ、更に、30℃で一晩インキュベートした。微小コロニーを選び、ミニプラスミドの調製物を分析した(沸騰法, Maniatis, et al., 上述)。これらのクローンの大部分は約8 kbのXbaI断片を含んでいた。この後述の実験の原理は、BamHIクローンの増殖が乏しいため、やはりゆっくりと増殖するXbaIコロニからT. リトラリスポリメラーゼ遺伝子を含むプラスミドを単離する機会が増大するということである。又、より低温度のインキュベーションの結果、細胞当たりのpUC19 プラスミドのコピーがより少なくなる。これらの結果により、T. リトラリスポリメラーゼ遺伝子は大腸菌にとって有毒であることの証拠が得られた。先に記載されたポリメラーゼ活性アッセイを用いては、これらのクローン中には、熱安定性ポリメラーゼ活性は検出されなかった。制限分析により、XbaIクローンは、完全なポリメラーゼ遺伝子を含むはずであることが示された。Fig. 2を参照せよ。

【0102】NruIライブラリー

NruIで切断した約0.3 µgのNEB 619のDNA(先のBamHIライブラリー)を、XbaIcライブラリーについて記載したのとまさに同じように、HincIIで切

断した0.1 µgのpUC19のDNAに連結した。再び、細胞を37℃でインキュベートした場合、ハイブリッド形成によっては陽性物は発見されなかったが、形質転換体を30℃でインキュベートした場合には多くのコロニーが観察された。これらの微小コロニーの大多数は、約5.5 kbのNruI挿入断片を含んでいた。先に記載したポリメラーゼ活性アッセイを使用しては、これらのコロニー中には、熱安定性ポリメラーゼ活性は検出されなかった。これらのコロニーの分析により、T. リトラリスポリメラーゼの転写の方向が、pUC19内のLacZと同じである場合には、そのコロニーは37℃においては増殖せず、かつ、極度に不安定であることが決定された。

【0103】しかしながら、クローンNru21のように、T. リトラリスポリメラーゼの転写の方向がpUC19内のLacZの反対であるコロニーは、より安定である。このことは、T. リトラリスポリメラーゼの転写は大腸菌にとって有害であることを示しており、更に、完全な遺伝子をクローン化することがなぜそんなに困難であるのかを説明することができる。制限地図分析は、NruIクローンは完全なポリメラーゼ遺伝子を含むはずであることを示していた。Fig. 2を参照せよ。

【0104】

ポリメラーゼの直接クローニングに関する結論

T. リトラリスは約90-95 kDaであり、完全な遺伝子をコードするには約2.4-3.0 kbのDNAを必要とする。T. リトラリスポリメラーゼ遺伝子のアミノ末端をコードし、先に論議したBamHI、XbaI、及び、NruIクローン内に発見される1.3 kbのEcoRI断片の制限地図分析により、3種類全てのクローンは完全なポリメラーゼ遺伝子を含むことが示される。これら全てのより大きいクローンは大腸菌内では不安定であった。従って、そのポリメラーゼのクローニングについて、以下に示すその代替りの方法を試した。

【0105】D. T. リトラリスポリメラーゼ遺伝子のもう一つの半部分のクローニング

T. リトラリスの完全なポリメラーゼ遺伝子を大腸菌内でクローニングする場合、それ自身の内因性調節下にあるにもかかわらず、遺伝子内の突然変異が生じると考えられている。不活性な突然変異体を選択することを回避するため、各々を引き離すとそれぞれ不活性であり、従って、互いに対照しては選択されない2つもしくはそれを上回る数のT. リトラリスゲノムからそのポリメラーゼ遺伝子をクローニングした。そのT. リトラリスゲノムの制限地図分析を利用して、どの制限酵素がT. リトラリスポリメラーゼ遺伝子のもう一つの半部分をクローニングするのに適切である断片を産生するかを決定した。先のデータは、T. リトラリスポリメラーゼの発現は大腸菌にとって有毒であることを示しはするものの、コーディング領域内もしくはその外側のDNA配列それ自身も、やはり同性を有する可能性がある。従って、完全な

遺伝子をコードすることができる最低のサイズの断片を、最高の選択物として決定した。制限分析により、恐らくポリメラーゼ遺伝子を全て満たすことができるアミノ末端の1.3 kbのEcoRI断片 (Fig. 2を参照せよ) の3' 端に近接する約1.6 kbのEcoRI断片が存在することが示された。

【0106】T. リトラリスDNAポリメラーゼ遺伝子のもう一つの半部分についてのハイブリッド形成プローブ

先のクローンのいずれも熱安定性ポリメラーゼ活性を発現しなかったため、それらが、コーディング配列内に蓄積した突然変異を有している可能性があり、そのため、その遺伝子のもう一つの半部分の適切な源にはなりえない。従って、ゲノムから下流の断片をクローン化する目的で、ハイブリッド形成プローブが必要であった。クローンNru21 (このNru21 クローンは、そのポリメラーゼ遺伝子の出発点から約300 bp上流で開始する約5.5 kbの挿入断片を含む) からの約3.2 kbのNdeI/ClaI断片をpSP73内 (プロメガ社) ヘサブクローン化してクローンNC11を作成した。CaCl₂ 感受性RRI細胞を、先に示すように、連結反応混合物で形質転換させた。形質転換体のミニプラスミド調製物をNdeI及びClaIでの消化により分析し、T. リトラリスの3.2 kbのNdeI/ClaI断片を含むクローンNC11を同定した。このクローンは大腸菌内で安定であった。このNC11挿入断片の配列決定を行った (Sanger, et al., PNAS, (1977) 74: 5463-5467)。ClaI端は、V27-5.4の配列 (T. リトラリスポリメラーゼのアミノ端をコードする1.3 kbのEcoRI断片) と同一であった。この1.3 kbのEcoRI結合点及びそれより先の配列を1.3 kbのEcoRI断片の配列に由来するプライマーを使用して決定した。NdeI端は、ベクター内に含まれるプライマーから配列決定した。

【0107】EcoRI ゲノムライブラリーのスクリーニング

10 µgのNC11を、100 µlのEcoRIバッファー内において30 UのEcoRIで、37℃で2時間消化した。約1.6 kbのEcoRI断片を、電気泳動後、DE-81ペーパー (ホワットマン社) 上で精製した。約1.6 kbのEcoRI断片を放射能ラベルし、当初のEcoRIラムダーgt11ライブラリーを探索するのに用いた。感染及びブランクリフトは、先のように行った。3つの陽性物を同定し、更に、ブランク精製した。全てのものは、約1.6 kbのEcoRI断片を含んでいたが、幾つかのものは、他の挿入断片をも含んでいた。

【0108】EcoRIライブラリーも、ラムダーZapII中に作製した。2 µgのT. リトラリスDNAを、20 UのEcoRIで、20 µlのEcoRIバッファー中において37℃で5時間消化し、その後、65℃で15分間熱処理した。約15ナノグラムのT. リトラリスDNA/EcoR

Iを、EcoRIで切断してフォスファターゼ処理した0.5 µgのラムダーZapII DNA (ストラタジーン) に対して、0.5 µlのT4 DNAリガーゼ (ニュイングランド バイオラボズ社, No. 202) を用いて5 µlの結合連鎖反応バッファー中で16℃で一晩連結させた。4 µlの連結させたDNAを封入した (ギガバック ゴールド、ストラタジーン社)。感染及びブランクリフトは先のように行った。約1,500のファージを、放射能ラベルした約1.6 kbのEcoRI断片で先のように探索した。5つのハイブリッド形成陽性ブランクを選択し、更に、3つのブランクを精製した。2つのファージ (NEB620及びV109-2) を、製造元の説明書 (ストラタジーン社) に従うインビボでの切除により、pBluescript組換え体として (V117-1及びV117-2) 生かしておいた。両者とも約1.6 kbのEcoRI断片及び異なる第2断片を含んでいた。5'端を配列決定したところ、NC11から決定された配列 (ClaI/NdeI断片) に一致した。Fig. 2を参照せよ。このEcoRI断片は、Wang, et al., 上述、により記載されているような、T4のDNAポリメラーゼ類の相同性群の3/6を含む。1.6 kbのEcoRI断片は、Fig. 6のヌクレオチド1269から2856を含む。

【0109】1.6 kbのEcoRI及びClaI/NdeI断片の配列は、1.9 kbのEcoRI断片はポリメラーゼ遺伝子を完全に含むのに必要であることができることを示した。NEB620について先に記載したように、ラベル化したプローブを用いて、1.9 kbのEcoRI断片を含むラムダーZapIIファージ、V110-1からV110-7を同定した。2つのファージ (V110-2及びV110-4) は、製造元 (ストラタジーン) の説明書に従うインビボでの切除により、pBluescript組換え体として (V153-2及びV153-4) 生かしておいた。両者とも約1.9 kbのEcoRI断片及び異なる第2断片を含んでいた。この1.9 kbのEcoRI断片は、NC11中の重複領域との配列相同性を有した。この1.9 kbのEcoRI断片は、Fig. 6のヌクレオチド2851から4771を含む。

【0110】T. リトラリスの完全なポリメラーゼ遺伝子を、不安定でありかつ活性酵素が検出されなかったBamHI、XbaI、及び、NruI断片としてクローン化した。この遺伝子を、やはり、4つの断片内 (1.3 kbのEcoRI断片、約1.6 kbのEcoRI断片、約1.9 kbのEcoRI断片、及び、停止コドンを含むEcoRI/BamHI断片) にクローン化した。1.3 kbのEcoRI断片は、安定にポリメラーゼのアミノ末端蛋白質を発現する。

【0111】実施例3

活性なT. リトラリスDNAポリメラーゼのクローニング

バクテリオファージNEB619 (ATCC619) の、14 kbのBamHI制限断片上に見いだされるT. リトラリスポ

リメラーゼ遺伝子を、Sanger, et al., PNAS (1977) 74: 5463 - 5467, の方法を使用して配列決定した。1.3 kbのEcoRI 断片の5' 端から始めて5837bpの連続的なDNA配列 (SEQ ID NO:1) を決定した (位置NT 1)。Fig. 6を参照せよ。

【0112】このDNA配列の分析から、ポリメラーゼ遺伝子は1.3 kbのEcoRI 断片内のNT291において開始することが決定された。NT5397に始まる翻訳停止部位も探索した。T. リトラリスポリメラーゼのみせかけの分子量は約90-95kDaであったため、この遺伝子が~2900bpであるはずであることが予想された。その代わり、1702のアミノ酸 (aa) もしくは~185kDaのコーディング容量を有する5106bpの読み取り枠 (ORF) を同定した。

【0113】他のDNAポリメラーゼとの配列相同性により (この例はFig. 7に示した)、T. リトラリスのポリメラーゼ遺伝子は、DNAポリメラーゼの共通相同領域III内のイントロンもしくは介在配列 (本明細書中においては、以後「IVS-I」とする) により中断されていることが発見された。 (Wang, T., et al., FASEB Journal (1989) 3:14 - 21, この開示は、本明細書中において、引用文献として取り込んである)。共通DNAポリメラーゼ相同領域IIIの保存されているアミノ酸をFig. 7において示している。このFig. 7において見られるように、T. リトラリスの相同性群III (SEQ ID NO:2) の左側は、NT1737において始まり、かつ、その共通配列に対する相同性は、Asn 及びSer 残基以降消失する。T. リトラリスの相同群III (SEQ ID NO:3) の右側を、NT3384、Asn 及びSer 残基において選択することができる。この2つのT.

本来の配列 (ヌクレオチド288-293) . . . TTT ATG . . .

新しい配列

Clal部位 (約528塩基対) に対して新しく作成したNdeI部位からの配列を、発現ベクターの作製に用いた。

【0118】2. NC11 (実施例2、パートD) のClal及びPvuI部位の間の約899bp配列。

【0119】3. Fig. 12に示しているように、介在配列を橋渡しして他の断片に由来するPvuIとBsu36I部位とを結合させる、合成二重らせん。

【0120】Fig. 12においては、最初のラインは、スプライス結合物の5' 端における本来の配列を示し (ヌクレオチド1721-1784、SEQ ID NO:1)、2番目の列は、スプライス結合物の3' 端の本来の配列を示し (ヌクレオチド3375-3415、SEQ ID NO:1)、かつ、3番目の列は、合成二重らせんオリゴヌクレオチドの配列を示している。

【0121】4. バクテリオファージNEB619 (実施例2、パートC) に由来する、約2500塩基対の、Bsu36IからBamHI までの断片。

リトラリスポリメラーゼのアミノ酸配列を、Fig. 7におけるようにAsn及びSer 残基が重複するように配置する場合、このDNAポリメラーゼ相同領域IIIに対して非常に良く調和する位置が存在することが明白であった。

【0114】従って、相同性のデータを使用して、ある介在配列がT. リトラリスのDNA内に存在しており、そのDNAポリメラーゼの相同領域IIIの左半分と右半分とを分割していることが予想された。

【0115】ある好ましい実施態様においては、介在配列を、介在配列のスプライス結合点付近に存在するコーディング領域内における非反復の制限酵素部位を同定することにより削除した。合成の二重オリゴヌクレオチドを合成し、この2つの制限断片の間を橋渡しするのに用いた。カルボキシ端制限断片の複数部分の結合連鎖反応、橋渡ししたオリゴヌクレオチド、アミノ端制限断片、及び、発現ベクターの結果、介在配列を除去した完全なポリメラーゼ遺伝子を含む発現ベクターを形成した。

【0116】具体的には、介在配列を除去したT. リトラリスDNAポリメラーゼ遺伝子を含む、本発明の発現ベクターを作製するのに用いるDNA断片もしくは配列は、以下に示すようなものである：

1. ポリメラーゼのコーディング領域の開始コドンがNdeI部位内に含まれるように、プラスミドV27-5.4 (実施例2、パートB) 内におけるオリゴヌクレオチド特異的突然変異誘発 (Kunkel, et al., Methods in Enzymology (1987) 154: 367: 382) により、NdeIを作成した。

【0117】

. . . CAT ATG . . .

【0122】5. pET11c (Studier, Methods in Enzymology, (1990) 185:66 - 89) に由来する、ベクターの支柱をなす約6200塩基対のBamHI からNdeIcまでの断片であり、以下の項目を含む：

- a) 遺伝子10の蛋白質についてのT7phi 10のプロモーター及びリボソーム結合部位
- b) アンピシリン耐性遺伝子
- c) lacIq 遺伝子
- d) プラスミドの複製起点
- e) 4回繰り返しているリボソーム転写ターミネーター (rrnb)、Simons, et al. Gnen (1987) 53:85-96。

【0123】先のDNA断片、1-5を、T4のDNAリガーゼを使用する適切な条件下で、順々に結合した。正しい構造を制限分析により同定し、pPR969と命名した。Fig. 8を参照せよ。pPR969を使用して、大腸菌株RIを形質転換させ、NEB687と表示される株を作

製した。NEB 687の試料は、1990年12月7日に、アメリカン タイプ カルチャー コレクションに寄託し、受託番号ATCC No. 68487 となっている。

【0124】他の好ましい実施態様においては、介在配列を除去したT. リトラリスのポリメラーゼ遺伝子を、T7のポリメラーゼ発現ベクターpET11c (Studier、(1990)、上述)の誘導体内へクローン化した。この組換えプラスミド174-1B1を使用して大腸菌株BL21 (DE3) pLysSを形質転換し、株175-1B1を作成し、NEB 671と命名した。Fig. 5及び10を参照せよ。

【0125】NEB 671の試料を、1990年10月17日に、アメリカン タイプ カルチャー コレクションに寄託し、受託番号ATCC No. 68447 となっている。

【0126】そのポリメラーゼの予想された分子量と、観察された分子量との間の比較により、たとえIVS Iが除去されているにせよ、ある矛盾が示された。領域I I IにおいてIVS Iを除去した後のポリメラーゼの予想される分子量は132Kbであるのに対し、天然の(実施例1を参照せよ)もしくは組換え(実施例4を参照せよ)ポリメラーゼのいずれのものの観察された分子量は約95kDである。この分子量の矛盾は、相同領域I内のイントロン(本明細書中、以後「IVS 2」とする)に起因するものである。この知見は以下に示す観察結果に基づいている: 相同領域I I IとIとの距離は、数々のpol アルファー類においては15-135アミノ酸へと変化する(Wang、(1989)、上述)。T. リトラリスにおいては、407のアミノ酸もしくは~44-kDが存在して、これらの領域を分断している。T. リトラリスDNAポリメラーゼは、何の類似性も存在しない、保存されている相同領域IとI I Iとの間の360アミノ酸を除いては、ヒトのpol アルファーに非常に類似している。結局、共通領域Iは観察されていない。

【0127】更に、SDS-PAGEにより決定したところ、約42-47kDの熱安定性エンドヌクレアーゼも、やはり本発明のT. リトラリスDNAポリメラーゼクローンにより産生されている(実施例10を参照せよ)。このエンドヌクレアーゼを、標準的なイオン交換クロマトグラフィーにより均一物に精製し、更に、アミノ末端の配列決定を行った。このエンドヌクレアーゼの最初の30のアミノ酸は、ポリメラーゼクローン(SEQ ID NO:1)のヌクレオチド3534で始まってコードされているアミノ酸に関連している。これは、他の既知のポリメラーゼとの相同性を持たないポリメラーゼの一部に関連している。このエンドヌクレアーゼは、坑-T・リトラリスDNAポリメラーゼ抗血清と反応しない。このエンドヌクレアーゼがポリメラーゼの外へスプライスされてくる正確な機構は未知であるにもかかわらず、それは大腸菌及びT. リトラリスの両方において自発的

に生じる。

【0128】実施例4

組換えT. リトラリスDNAポリメラーゼの精製

大腸菌NEB 671 (ATCC No. 68447)を、100リットルの発酵器内で、10g/リットルのトリプトン、5g/リットルのイースト抽出物、5g/リットルのNaCl、及び、100mg/リットルのアンピリシンを含む培地中で、35℃において増殖させ、更に、中間対数増殖期において0.3mMのIPTGで誘導し、更に又4時間インキュベートした。この細胞を遠心により収集し、-70℃に保存した。

【0129】580グラムの細胞を解凍し、バッファーA(100mMのNaCl、pH7.0の25mMのKPO₄、0.1mMのEDTA、0.05%のTriton X-100、及び、10%のグリセロール)中に懸濁して、総容量を2400mlとした。この細胞を、ゴーリンのホモジナイザーを通すことにより溶菌化させた。この未精製抽出物を遠心により清澄化させた。清澄化させた未精製抽出物の容量を、さきのバッファーで2200mlに合わせ、更に、75℃で30分間加熱した。粒状物質を遠心により除去し、残存している上清は、約3120mgの可溶性蛋白質を含んでいた。

【0130】この上清を、フォスフォセルロースカラム(5×11cm; 216mlの支持体容量)に接続してあるDEAE-セファロースカラム(5×13cm; 255mlの支持体容量)に供した。大量の酵素を含むDEAE-セファロースの通り抜け分画は直ちにフォスフォセルロースカラムへ移っていった。両方のカラムを、300mlのバッファーAで洗浄し、2本のカラムの接続をはずし、更に、フォスフォセルロースカラム上の蛋白質を、バッファーA中に形成されている0.1Mから1MのNaClの2リットルの直線濃度勾配液で溶出した。

【0131】このカラム分画をDNAポリメラーゼ活性についてアッセイした。簡潔に述べると、1-4μlの分画を、30μMの各dNTP、及び、³H-ラベルしたTTP、0.2mg/mlの活性化したウシ胸腺DNA、及び、100μg/mlのアセチル化したBSA(アセチル化されていないBSAが好ましいことが知られている)を含む、50μlの1× T. リトラリスDNAポリメラーゼバッファー(10mMのKCl、20mMのトリス-HCl(24℃においてpH8.8)、10mMの(NH₄)₂SO₄、2mMのMgSO₄、及び、0.1%のTriton X-100)内で75℃で5-10分間インキュベートした。この混合物をホワットマンの3mmフィルターに供し、更に、そのフィルターを、10%のTCAでの3回の洗浄、次には、冷却したイソプロパノールでの2回の洗浄に供した。フィルターの乾燥後、DNA内への³H-TTPの取り込みを表す結合した放射活性を測定した。活性分画を一まとめにし、更に、dNTPレベルを200μMの各dNTPに引き上げたことを除

く先のアッセイ条件を使用して、各プールにおける酵素活性レベルを評定した。これらの条件下では、1単位の酵素活性を、75℃30分において、酸不溶性物質内へ10nモルのdNTPを取り込む酵素の量として定義した。

【0132】66mgの蛋白質を含む、300ml容量からなる活性分画を、バッファーB（400mMのNaCl、pH7.0での10mMのKPO₄、0.1mMのEDTA、0.05%のTriton X-100、及び、10%のグリセロール）で平衡化したヒドロキシアパタイトカラム（2.5×5cm; 25mlの支持体容量）へ供した。この蛋白質を、バッファーB中に形成される10mMから500mMのKPO₄の250mlの直線濃度勾配液で溶出した。27mg蛋白質を含む59mlからなる活性分画を一まとめにし、バッファーC（200mMのNaCl、pH7.5での10mMのトリス-HCl、0.1mMのEDTA、0.05%のTriton X-100、及び、10%のグリセロール）に対して透析した。

【0133】その透析物をヘパリン-セファロースカラム（1.4×4cm; 6mlの支持体容量）に供し、20mlのバッファーCで洗浄した。バッファーC中に形成される200mMから700mMのNaClの100mlの直線濃度勾配液をそのカラムに供した。16mg蛋白質を含に40mlからなる活性分画を一まとめにし、バッファーCに対して透析した。

【0134】この透析物をアフィゲル ブルークロマトグラフィーカラム（1.4×4cm; 6mlの支持体容量）に供し、20mlのバッファーCで洗浄し、更に、蛋白質を、バッファーC中に形成される0.2Mから2MのNaClの95mlの直線濃度勾配液で溶出した。11mgの蛋白質を含む、30ml容量からなる活性分画を、200mMのKCl、10mMのトリス-HCl（pH7.4）、1mMのDTT、0.1mMのEDTA、0.1%のTriton X-100、100μg/mlのBSA、及び、50%のグリセロールを含む保存バッファーに対して透析した。

【0135】先に取得されたT. リトラリスDNAポリメラーゼは、20,000-40,000単位/mgの特異活性を有した。

【0136】

組換えT. リトラリスポリメラーゼの性質決定

組換え及び天然のT. リトラリスポリメラーゼは、5-10%のSDS-PAGEの密度勾配ゲルにおいて電気泳動する場合、同一のみかけ上の分子量を有した。組換えT. リトラリスポリメラーゼは、天然のT. リトラリスポリメラーゼと同様の3'→5'エキソヌクレアーゼ活性を有しており、これは、dNTPによる阻害についても感受性を示す。

【0137】実施例5

セルモコッカス・リトラリスDNAポリメラーゼ遺伝子の過剰発現

例えば、実施例3において取得されたV174-1B1のような、IVS1を削除してあるT. リトラリスDNAポリメラーゼ遺伝子を、数々の方法、もしくはそれを組み合わせたものに使用して、クローン化したT. リトラリスDNAポリメラーゼの最高の発現を得ることができ。

【0138】このようなある方法は、T. リトラリスDNAポリメラーゼ遺伝子をその内因性調節要素から分離し、その後、そのポリメラーゼ遺伝子を、T7発原ベクター（Rosenberg, et al., Gene (1987) 56:125-135）のような非常に協力的に調節されているプロモーターに遺伝子操作を利用して結合させることを含む。強力なプロモーターの挿入は、T. リトラリスのDNAポリメラーゼ遺伝子の両端付近の都合の良い制限標的、及び、プロモーター付近のベクター上の適合性制限標的を同定すること、あるいは、部位特異的突然変異誘発（Kunkel, (1984)、上述）を用いる制限標的の作製、及び、強力なプロモーターの転写及び翻訳調節下におけるも同一の方向で、ベクター内にT. リトラリスDNAポリメラーゼ遺伝子を転移することにより行うことができる。

【0139】T. リトラリスDNAポリメラーゼは、T. リトラリスDNAポリメラーゼ遺伝子の上流に位置する強力なリボソーム結合部位を利用することにより過剰発現させてその遺伝子の発現を増大させることができる。Shine and Dalgarno, Proc. Natl. Acad. Sci. USA (1974) 71: 1342-1346、これは、本明細書中に引用文献として取り込んである、を参照せよ。

【0140】T. リトラリスDNAポリメラーゼ遺伝子の発現を増大させるための他の方法は、部位特異的突然変異誘発もしくは再合成によりその遺伝子のDNA配列を変化させて、大腸菌よりもより効果的に利用される開始コドンを含むようにすることを含む。

【0141】結局、T. リトラリスDNAポリメラーゼは、イースト及びバキュロバイラスのような真核生物系においてより安定であることができる。

【0142】T. リトラリスDNAポリメラーゼは、T. リトラリスDNAポリメラーゼ遺伝子を所有するクローンから、適切な抗生物質を含む栄養分に富む培地中における発酵器内での増殖により産生することができる。その後、細胞を遠心により収集し、更に、超音波処理により破壊してT. リトラリスのポリメラーゼ活性を含む未精製の細胞抽出物を産生する。

【0143】T. リトラリスDNAポリメラーゼ活性を含むこの未精製抽出物を、実施例1に記載されている方法により、あるいは、親和性クロマトグラフィーもしくはイオン交換クロマトグラフィーのような標準的な産物精製技術により精製する。

【0144】実施例6

T. リトラリスDNAポリメラーゼの3'から5'への

エキソヌクレアーゼ変異体の産生

asp141及びglu143についてのコドンアラニンについてのコドンに変えるための部位特異的突然変異誘発を使用して、3'から5'方向へのエキソヌクレアーゼ活性を持たないT₄リトリスDNAポリメラーゼを作製した。部位特異的突然変異誘発を使用して、phi29 (Cell (1989) 59: 219-228) のDNAポリメラーゼI (Science (1988) 240: 199-201)、及び、T7のDNAポリメラーゼ類(米国特許番号No. 4,942,130)を含む、エキソヌクレアーゼ活性を低減することが報告されているDNAポリメラーゼの変異体を作製した。

【0145】本発明のポリメラーゼの部位特異的突然変異誘発は、Kunkel, T.A., PNAS (1985) 82: 488-492 (この開示は、本明細書中において引用文献として取り込んである)、により記載されている技術の改良法を使用して行った。V27-5. 4プラスミド(実施例2のパートBを参照せよ)を、部位特異的突然変異体を作製するのに用いた。V27-5. 4は、pBluescript SK+中に存在する1.3 kbのEcoRI断片をコードする。デオキシチミジンの代わりにデオキシウラシルを取り込み、

アミノ酸残基についての、本来の及び改変した配列は141、142、及び、143である：

	..asp ile glu
本来のもの：	..GAT ATT GAA
	..ala ile ala
改変したもの：	..GCG ATC GCA

改変についてのスクリーニングに使用される、新しく作製されたPvuI部位に下線を施した。中間のコドンを変化させているが、その新しいコドンによりコードされるアミノ酸は、以前のものと同一であることに注目せよ。

【0148】V174-1B1 (実施例3を参照せよ)からの約120 bpのClaIからNcoIまでの断片を相関する断片で置き換え、pAJG2から先の置換体を生じ、pCAS4を産生した(Fig. 9を参照せよ)。従って、4つの塩基対、つまり、先に記載したものがV174-1B1とは異なっている。

【0149】大腸菌BL21 (DE3) plysS (Methods in Enzymology (1990) 185: 60-89)をpCAS4で形質転換させて株NEB681を作製した。突然変異体T₄リトリスポリメラーゼの発現は、IPTGの添加により誘導した。

【0150】NEB681の試料は、1990年11月8日にアメリカンタイプカルチャーコレクションに寄託し、ATCC No. 68473となっている。

【0151】天然のT₄リトリスDNAポリメラーゼ及び大腸菌NEB681から単離したエキソヌクレアーゼマイナス変異体中における比較エキソヌクレアーゼ活性を、一様に[³H]ラベルした大腸菌DNA基質を使用して決定した。野生型のT₄リトリスDNAポリメラーゼは、ニューイングランドバイオラボズ社により

V27-5. 4プラスミドを含む株である大腸菌株CJ236 (Kunkel, et al., Methods in Enzymology (1987) 154: 367-382)を、f1のヘルパーファージIR1 (Virology, (1982) 122: 222-226)で重感染させて、このプラスミドの1本らせん版を産生した。

【0146】簡潔に述べると、部位特異的突然変異体は、以下に示す方法を利用して作製した。最初に、35塩基分の長さである突然変異体オリゴヌクレオチドプライマーを標準的な方法を使用して合成した。このオリゴヌクレオチドを一本鎖の鋳型に対してハイブリッド形成させた。ハイブリッド形成後、このオリゴヌクレオチドをT4 DNAポリメラーゼを使用して伸張した。結果として得られる2重らせんのDNAを、T4 DNAリガーゼでの処理により、閉じた環状のdsDNAに変換した。以下に示すような、変化させられた塩基と重複するPvuI部位の作製により、突然変異後にこの探索対象物を含むプラスミドを同定した。このようなプラスミドの一つを同定し、pAJG2と命名した。

【0147】

現在市販されている高度に精製したロットからのものである。エキソヌクレアーゼマイナス変異体を、DEAEセファロース及びフォスフォセルロースカラムを通して部分的に精製して、エキソヌクレアーゼアッセイを妨害する混入物類を除去した。表示されているポリメラーゼの単位数を、T₄リトリスDNAポリメラーゼバッファー[20 mMのトリス-HCl (25℃においてpH 8.8)、10 mMのKCl、10 mMの(NH₄)₂SO₄、5 mMのMgSO₄、0.1%のTriton X-100]、0.1 mg/mlのウシ血清アルブミン、及び、3 µg/mlのDNA基質(特異活性200,000 cpm/µg)を含む0.1 mlの反応物に添加し、更に、この反応物に無機油を重層して反応物の蒸発を防いだ。同一の反応物は、更に20 µMのdNTPを含み、それについては、以前に、野生型の酵素のエキソヌクレアーゼ活性を阻害することを示してある。完全な反応混合物を70℃で60分間インキュベートし、次に、その0.08 mlを除去し、0.02 mlの0.5 mg/mlの超音波処理したニシンの精子DNA(完全なDNAの沈殿を補助するため)、及び、0.2 mlの10%トリクロロ酢酸と4℃下で混合した。混合後、この反応物を、氷上で5分間インキュベートし、更にその後、DNAを、エッペンドルフ社の遠心機内で、4℃において5分間ベレット化させた。0.25 mlの上清を、シンチレーション溶液と混合

し計数した。バックグラウンド値を補正した試料計数の結果をFig. 11に示した。

【0152】Fig. 11においてFig. 示されるように、エキソヌクレアーゼマイナス変異体は、天然のポリメラーゼが明らかにエキソヌクレアーゼ活性を示す条件下において、dNTPが存在していても、存在していなくても、実質的にエキソヌクレアーゼ活性を有さなかった。内輪には、バックグラウンド値を2倍以上越える活性レベルが検出されたものと見積り、これにより、エキソヌクレアーゼ活性は、この変異体においては少なくとも60倍低減したことを示す。

【0153】実施例7

T. リトラリスDNAポリメラーゼの半減期の決定

実施例1において先に記載したように調製したT. リトラリスDNAポリメラーゼの熱安定性もしくは半減期を、以下に示す方法により決定した。精製したT. リトラリスDNAポリメラーゼ(25単位)を、以下に示すバッファー中で100℃において予めインキュベートした: 70mMのトリス-HCl(25℃においてpH8.8)、17mMの硫酸アンモニウム、7mMのMgCl₂、10mMのベーターメルカプトエタノール、200μMの各デオキシヌクレオチド、及び、200μg/mlのDNAアーゼ処理したDNA。当初の試料を時間ゼロに採取し、5%の酵素混合物に等価な小分注を、10、20、40、60、90、120、150、及び、180分に除去した。ポリメラーゼ活性を、以前に記載したように、DNA内へのデオキシヌクレオチドの取り込みを決定することにより測定した。

【0154】ニューイングランド バイオラボズ社から取得したTaqのDNAポリメラーゼの試料を先のアッセイに供した。当初の試料を時間ゼロに採取し、5%の酵素混合物に等価な小分注を、4、7、及び、10分に除去した。Fig. 3に示されるように、100℃におけるT. リトラリスDNAポリメラーゼの半減期は60分であり、一方、100℃におけるTaqのポリメラーゼの半減期は4.5分であった。

【0155】Fig. 3Aに示されるように、安定剤が存在しない状態における100℃でのT. リトラリスDNAポリメラーゼの半減期は60分であるのに対し、安定剤であるTriton X-100(0.15%)、あるいは、BSA(100μg/ml)の存在下における半減期は95分であった。これは、安定剤の存在下あるいは非存在下において4.5分である、100℃でのTaqのDNAポリメラーゼの半減期に対してははっきりとした対照を見せた。

【0156】実施例4において先に記載したように精製した組換えT. リトラリスDNAポリメラーゼの熱安定性もしくは半減期は、約90℃を越える温度において、2相性の加熱不活性化曲線を有することを発見した。これらの2つの相を、約5分及び7時間の半減期により性

質決定した(Fig. 3B)。極端な温度におけるより一貫性のある動態を提供するために、追加的な精製段階を使用して、このポリメラーゼのより熱感受性な要素を除去することができる。

【0157】具体的には、実施例4の最終酵素調製物を100℃で15分間加熱し、その後、氷上で30分間冷却した。沈殿した蛋白質を、12,000×gにおける、4℃での10分間の遠心により除去した。初期のポリメラーゼ活性の約20%がこの過程で消失した。残存しているDNAポリメラーゼは1相性の加熱不安定化曲線を示し、95℃における半減期は約7時間であった。結果として生じたポリメラーゼも又、天然の酵素、及び、実施例4にしたがって調製した組換え酵素に類似する、75℃における動力学的性質を示した。

【0158】実施例8

3'-5' ブルーフリーディング活性の決定

1. デオキシヌクレオチド類の非存在もしくは存在に対するT. リトラリスDNAポリメラーゼの反応

ポリメラーゼ類に関連するエキソヌクレアーゼ活性のレベルにより、デオキシヌクレオチド類に対して非常に異なる反応が示される。非ブルーフリーディング5'-3'エキソヌクレアーゼは、デオキシヌクレオチド類の存在に付随して生じる重合化により10倍もしくはそれを越える程度刺激化される一方で、ブルーフリーディング3'-5'エキソヌクレアーゼは、付随して起こる重合化により完全に阻害される。Lehman, I.R., ARB (1967) 36: 645。

【0159】T. リトラリスDNAポリメラーゼ、あるいは、性質が良く分析されているエキソヌクレアーゼ機能を有するポリメラーゼ類(T4のポリメラーゼ、クレノウ断片)を、重合化バッファー(70mMのトリス(24℃でpH8.8)、2mMのMgCl₂、0.1%のTriton、及び、100μg/mlのウシ血清アルブミン)中において、1μgの3H-チミジンラベルした2重らせんのDNA(10⁵ CMP/μg)を加えてインキュベートした。70℃(好熱性ポリメラーゼ)もしくは37℃(中温性ポリメラーゼ)のいずれかにおける、3時間(実験1)もしくは4時間(実験2)のインキュベーション期間後、エキソヌクレアーゼの加水分解した塩基を、酸可溶性の放射能ラベルした塩基の測定により定量化した。

【0160】表1に示すように、5'-3'エキソヌクレアーゼ活性を有するTaq DNAポリメラーゼは、デオキシヌクレオチド類が30μMで存在する場合に、エキソヌクレアーゼ活性の刺激化を示す。しかしながら、T4ポリメラーゼ、大腸菌ポリメラーゼIのクレノウ断片、もしくは、T. リトラリスDNAポリメラーゼのような、3'-5'ブルーフリーディングエキソヌクレアーゼ活性を有するポリメラーゼは、デオキシヌクレオチド類の存在に対して、逆のある阻害的反応を示した。

【0161】

【表1】

表 1

実験#	量	DNAポリメラーゼの種類	酸可溶性CPM (エキソヌクレアーゼ活性) *		
			no dNTPS	30 μ M dNTPS	添加NTPSに対する影響
1	2.5ユニット	Taq Polymerase	241	1936	8×増
	3 ユニット	T4 Polymerase	47608	6663	7×減
	10 ユニット	Klenowフラグメント (E. coli Pol. I)	11272	2845	4×減
2	5 ユニット	Taq Polymerase	338	2539	8×増
	5 ユニット	T4 Polymerase	46001	10418	>4×減
	5 ユニット	Klenowフラグメント (E. coli Pol. I)	8757	408	22×減
	5 ユニット	T. litoralis Polymerase	8573	795	11×減

*アッセイの非直線領域

T. リトラリスDNAポリメラーゼと、大腸菌のDNAポリメラーゼの性質が良く分析されているクレノウ断片との、デオキシヌクレオチド類の存在もしくは非存在に対する反応の類似性をFig. 4に示す。各ポリメラーゼの20単位を、先に記載した350 μ gの重合化バッファー中で、9 μ gの3H-チミジンラベルした2重らせんのDNA (10⁵ CMP/ μ g) と共に、30 μ Mのデオキシヌクレオチドの存在下もしくは非存在下においてインキュベートした。各時点で、50 μ lを除去し、更に、酸可溶性の放射能ラベルした塩基を測定した。Fig. 4が示すように、3'-5' ブルーフリーディングエキソヌクレアーゼ活性を含む、T. リトラリスDNAポ

リメラーゼと性質が良く分析されている大腸菌のDNAポリメラーゼのクレノウ断片との動態は非常に類似している。

【0162】 2. デオキシヌクレオチドの増加濃度に対するT. リトラリスDNAポリメラーゼの反応

ポリメラーゼのエキソヌクレアーゼ活性は、重合化中に存在するデオキシヌクレオチド類のレベルにより、それらのレベルが重合化に影響を与えるのと同じくらいの影響を受ける。デオキシヌクレオチドレベルを酵素のK_m (ミカエリス係数) まで引き上げると、重合の速度が上昇する。重合化の速度に対して感受性を示すポリメラーゼ類のエキソヌクレアーゼ機能については、エキソヌク

レアーゼ活性における変化が、デオキシヌクレオチド濃度の増大に対応する。重合化速度の増大は、ブルーフリーディング3' - 5' エキソヌクレアーゼ活性を劇的に減少させ、重合化に依存する5' - 3' エキソヌクレアーゼ活性の増大を伴う。

【0163】デオキシヌクレオチド濃度を10 μ M から100 μ M まで増大させて、T. リトラリスDNAポリメラーゼのエキソヌクレアーゼ機能を、他のポリメラーゼ類の良く性質が分析されているエキソヌクレアーゼ機能のものと比較した。エキソヌクレアーゼ活性を、30分のインキュベーション期間を使用して(1)に記載したように測定した。表2に要約してあるように、T. リトラリスDNAポリメラーゼは、3' - 5' ブルーフリーディングエキソヌクレアーゼ(大腸菌のDNAポリメラーゼIのクレノウ断片)を所有することが知られているポリメラーゼに類似して、デオキシヌクレオチドのレベルの増加に対して反応した。この反応は、このブルーフリーディング機能を所有しないことが知られているポリメラーゼ、つまり、TaqのDNAポリメラーゼのものと正反対であった。このポリメラーゼは、デオキシヌクレオチドのレベルの増大に反応し、その5' - 3' エキソヌクレアーゼ活性に起因するエキソヌクレアーゼ機能の増大を伴っていた。

【0164】

【表2】

表 2

量	DNAポリメラーゼの種類	酸可溶性CPM (エキソヌクレアーゼ活性)			dNTPSの増加に伴う加水分解への影響
		10 μ M dNTPS	100 μ M dNTPS	dNTPS	
5ユニット	Taq Polymerase	350	610		1.7×増
5ユニット	Klenowフラグメント E. coli Pol. I	650	300		2.2×減
5ユニット	T. litoralis Polymerase	100	110		1.6×減

3. 平衡化させたデオキシヌクレオチド状態から非平衡化状態への変化に対するT. リトラリスDNAポリメラーゼの反応

重合化は、DNA合成中に存在する等価レベルの4種類全てのデオキシヌクレオチド類に依存する。デオキシヌクレオチドレベルが等価でない場合には、ポリメラーゼは重合化速度を減少し、更に、恐らく誤った塩基を挿入するものと思われる。このような条件は、5' - 3' エキソヌクレアーゼ活性を減少させる一方で、ブルーフリーディング3' - 5' エキソヌクレアーゼ活性をかなり増加させる。Lehman, I.R., ARB (1967) 36: 645.

【0165】T. リトラリスDNAポリメラーゼを、平衡化させたデオキシヌクレオチドレベル (30 μ M)、と、dCTPが他の3種類のデオキシヌクレオチドのレベルの1/10もしくは1/100であるという性質である、2種類の非平衡化のレベルの両方を使用してインキュベートした。その後、T. リトラリスDNAポリメラーゼの反応を、3'-5'もしくは5'-3' エキソヌクレアーゼ機能のいずれかを所有する3種類のポリメラーゼのものと比較した。全てのアッセイは、以下に明細を記録するdCTP濃度を除外しては、(1)において記載されているように行った。以下に示す表3に示すように、T. リトラリスDNAポリメラーゼは、ブルーフリーディング3'-5' エキソヌクレアーゼを含むポリメラーゼについて予想される動態を伴い、つまり、デオキシヌクレオチドプール中の非平衡は、T4 DNAポリメラーゼもしくは大腸菌DNAポリメラーゼIのクレノウ断片のものと類似する様式でエキソヌクレアーゼ活性を増大させた。この反応とは対照的に、重合化が阻害される地点に非平衡を上昇させるまで、Taq DNAポリメラーゼのエキソヌクレアーゼは影響を受けなかった。

【0166】

【表3】

表 3

DNAポリメラーゼの種類 (5 units @)	酸可溶性CPM (エキソヌクレアーゼ活性)			
	no dNTPs	30 μ M dNTPs	30 μ M/3 μ M*	30 μ M/0.3 μ M**
Taq Polymerase	338	2539	2243	656
T4 Polymerase	***46001	10418	***43850	***46585
Klenowフラグメント of E. coli Pol. I	8757	408	1291	1755
T. litoralis Polymerase	8573	795	3471	3339

* 3 μ M dCTP, 30 μ Mその他全ての dNTPs

** 0.3 μ M dCTP, 30 μ Mその他全ての dNTPs

*** アッセイの非直線領域

4. エキソヌクレアーゼ活性の方向性

ブルーフリーディングエキソヌクレアーゼは、DNAについて3'-5'の方向性を有するが、一方で、DNAポリメラーゼ類に関連する非ブルーフリーディングエキソヌクレアーゼは5'-3'の方向性を有する。T. リトラリスDNAポリメラーゼのエキソヌクレアーゼ活性の方向を認識するために、アデノウイルスの5'を遮断したDNAを利用した。このDNAの5'端は蛋白質によって遮断されているため、方向性が5'-3'である酵素活性は、この2重らせんDNAを消化することができないが、しかしながら、エキソヌクレアーゼIIIもしくはブルーフリーディングエキソヌクレアーゼ含有性ポリメラーゼのような、3'-5'である酵素活性はアデノウイルスDNAを消化することができる。

【0167】25単位のエキソヌクレアーゼI I I、あるいは、T. リトラリスDNAポリメラーゼ、T4のDNAポリメラーゼ（良く性質分析されている3' - 5' エキソヌクレアーゼ活性を所有する）、もしくは、TaqのDNAポリメラーゼ（そのような活性を所有しない）のいずれかの20単位を、5 μ gのアデノウイルスのDNAと最高30分までの期間、37℃（T4ポリメラーゼ及びエキソヌクレアーゼI I I）もしくは70℃（Taqポリメラーゼ、及び、T. リトラリスポリメラーゼ）のいずれかで、70mMのトリス-HCl、25℃においてpH8.8、2mMのMgCl₂、及び、100 μ g/mlのBSAの存在下においてインキュベートした。各インキュベーション時間の最後に、アデノウイルスDNAのフェノール抽出により酵素活性を停止させ、次に、HpaI消化を37℃で1時間、20mMのトリス、25℃でpH7.9、10mMの酢酸マグネシウム、50mMの酢酸カリウム、及び、1mMのDTT内において行った。このDNA断片をアガロースゲル電気泳動に供し、結果として得られる、経時的分解及び引き続き生じる2重らせんDNA断片の消失の様式を査定した。

【0168】エキソヌクレアーゼI I I、T. リトラリスDNAポリメラーゼ、及び、T4DNAポリメラーゼの3' - 5' エキソヌクレアーゼ活性が、アデノウイルスDNAの遮断してある5' 端に由来する2重らせんDNA断片の消失の原因となっており、その3' 端が反応的となり易いことを示している。それと対照的に、5' - 3' 重合依存性エキソヌクレアーゼ活性を有するTaqDNAポリメラーゼはDNA断片の消失を示さなかった。

【0169】実施例9

PCR法におけるT. リトラリスDNAポリメラーゼの反応効率

T. リトラリスDNAポリメラーゼがポリメラーゼ連鎖反応（PCR）を行う能力をも調査した。実施例4において記載したバッファーを含む100 μ l 容量中において、4355bp及び2895bpの2つの断片を生じるC1aI消化により切断されたM13mp18のDNAの変化量を、任意の非特異的吸着効果を低減させるための担体DNAとして存在する200ngのウシの胸腺DNAと共にインキュベートした。正方向及び逆方向のプライマーが、1 μ M で存在した（正方向のプライマー=5' d（CCAGCAAGGCCGATAGTTTGA GTT）3' であり、かつ、逆方向のプライマー=5' d（CGCCAGGGTTTTC CCA GTCA CGA C）3' である）。これらのプライマーは、M13mp18の総DNAの14%を表す配列で、先に記載した4355bpの断片上の1kbのDNA配列の両端を挟み込む。更に、200 μ M の各dNTP、100 μ g/mlのBSA、10%のDMSO、及び、2.5単位のT. アクアティクスDNAポリメラーゼ（T. aquaticus）（0.

5%のNP40及び0.05%のTween 20の存在下もしくは非存在下）、あるいは、T. リトラリスDNAポリメラーゼ（0.10%のTriton X-100の存在下もしくは非存在下）が存在した。最初の周期は、95℃で5分、50℃で5分（そのポリメラーゼ及びBSAが添加される間）、及び、70℃で5分からなっていた。引き続き起こる各PCR周期の区分を以下に示す：93℃で1分、50℃で1分、及び、70℃で5分。

0、13、23、及び、40周期後、100 μ l 容量内のTween 20 μ l の量を除去し、1kbのDNA配列の増幅化を定量化するために臭化エチジウムが存在するアガロースゲル電気泳動に供した。

【0170】28ng及び2.8ng で存在するこの標的DNA配列を用いる当初の実験により、ポリメラーゼ連鎖反応を触媒化するT. リトラリスDNAポリメラーゼの能力が立証され、産生率は、T. アクアティクスDNAポリメラーゼに見られるものと比較できる量もしくは多くて2倍程度であった。

【0171】しかしながら、ポリメラーゼ機能の差異が最も顕著であったのは、標的DNA配列のより低いレベル、2.8フェムトグラムにおいてであった。各周期中のDNA伸長において、最高のポリメラーゼ安定性及び/又は効率を必要とするこれらの条件下において、T. リトラリスDNAポリメラーゼは、23周期以内では、T. アクアティクスDNAポリメラーゼと比較して4倍を越える大きさの量の増幅化されたDNAを産生した。

【0172】より少ない周期で非常に少量のDNAを増幅する能力は、PCRの多くの応用法にとって重要であり、それは、増幅化のためにかなりの回数の周期を利用することは、そのPCR過程での希望しない人工産物の作製に関係してくるためである。

【0173】実施例10

イントロンをコードする組換えT. リトラリスエンドヌクレアーゼの精製

実施例9において記載されているように増殖する大腸菌NEB671（ATCC No. 68447）を解凍し（70グラム）、ml当たり200 μ gのリゾチームを含むバッファーA中に、最終容量が300mlになるように懸濁した。この混合物を37℃で2分間、その後、75℃で30分間インキュベートした。加熱した混合物を、20,000 \times gで30分間遠心し、熱安定性エンドヌクレアーゼの更に進んだ精製のためにその上清を回収した。大腸菌に由来する全てのヌクレアーゼは熱処理により不活性化されたため、この段階における調製物をイントロンをコードするエンドヌクレアーゼの性質分析に使用することができた。この75℃の上清溶液中にも存在する組換えT. リトラリスDNAポリメラーゼからこの酵素を分離するために、この溶液をDEAEセファロースカラム（5cm \times 5cm、100mlの支持体容量）を通し、更に、200mlのバッファーAで洗浄した。主に全てのD

NAポリメラーゼ活性はカラムを通過する一方、エンドヌクレアーゼ活性は吸着する。このエンドヌクレアーゼ活性を、バッファA中に形成される0.1Mから0.8MのNaClの1リットルの直線濃度勾配液で溶出し、それを、10mMのKCl、20mMのトリス-HCl (24℃でpH8.8)、10mMの(NH₄)₄SO₄、10mMのMgSO₄、0.1%のTriton X-100、及び、1μgのpBR322を0.05mlの反応混合物当たり含むバッファ内でアッセイした。この反応混合物を75℃でインキュベートし、DNA開裂の範囲をアガロースゲル電気泳動により決定した。低い温度においては、殆どもしくは全くエンドヌクレアーゼ活性が検出されなかった。ピークを示す活性を含む試験管を一まとめにして、バッファAに対して一晚透析し、その後、フォスフォセルロースカラム(2.5cm×6.5cm、32mlの支持体容量)に供し、バッファAで洗浄し、更に、エンドヌクレアーゼ活性を、バッファA中に形成した0.1Mから1.5MのNaClの1リットルの直

5' TTGGTTATGCCGGTAC TGCCGGCCTCTT 3'
3' AACCAATACGGC CATGACGGCCGGAGAA 5'

位置2411の切断部位を含む領域：

5' TTGAGTGAGCTGATAC CGCTCGCCGCAG 3'
3' AACTCACTCGAC TATGGCGAGCGGCGTC 5'

IVS2をpBR969から削除する場合、結果として生じるプラスミド、pAKK4(実施例11)は、エキソン接続点

5' GGTTCTTTATGCGGAC*AC/TGACGGCTTTATG
3'
3' CCAAGAAATACGCC/TG*TGACTGCCGAAATAC
5'

星印(*)は、左側のエキソンと右側のエキソンとの間の領域を示し、それらは、IVS2の削除により互いに結合されている。

【0175】I-T11のホーミング部位における開裂は、50℃における、50mMのTRIS(pH7.9)、10mMのMgCl₂、100mMのNaCl、及び、1mMのDTTの反応条件を使用すると、「星印」の部位におけるものより100倍もより速く起こる。これらの条件下では、この酵素は大腸菌のDNAを6-10倍切断する。「星印」の開裂は、NH₄(10mM)、高めの温度(70-80℃)、及び、高めのpH9.8-10により促進される。

【0176】従って、T.リトラリスからのエンドヌクレアーゼは、切断部位における4種類の塩基の3'伸長がたびたび存在しかつ認識配列における同義性が存在することがあるとして報告されている、イントロンをコードする他のエンソヌクレアーゼ類に類似している。

【0177】イントロンの突然変異遺伝子内のこの切断部位は、イントロンをコードするエンドヌクレアーゼのホーミング部位として引用される。この分野において、イントロンをコードしているエンソヌクレアーゼ

線濃度勾配液で溶出した。酵素は約0.8MのNaClで溶出された。活性分画を一まとめにし、バッファAに対して一晚透析し、HPLCモノ-Sカラム(ファルマシア社)を通し、更に、0.05Mから1.0MのNaClの直線濃度勾配液で溶出した。活性は単一のピークとして溶出され、かつ、SDS-PAGEによると均一であり：つまり、単一の42-47kdのバンドがクマシーブルー染色により検出され、更に、このバンドをゲルから溶出させ、変成させた時点で、それはゲル上で検出されるエンドヌクレアーゼ活性のみを含んでいた。

【0174】この酵素は、多様なDNA上の好ましい切断部位を有する。大過剰で、更に、火道ポリメラーゼバッファ(ニューイングランドバイオラボズ社、ピバリー、マサチューセッツ州)中で使用する場合、この酵素は、ラムダーDNA上に複数の切断部位を、更に、pBR322上に3ヶ所の切断部位を有する。pBR322上の2つの急速部位の配列を決定した：

位置164の切断部位を含む領域：

において非常に感受性の高い高速反応部位を含む：

IVS2接続点における切断部位を含む領域：

は、そのイントロンを持たない遺伝子内の切断部位を認識し、かつ、このエンドヌクレアーゼによるそのDNAの開裂は、ホーミング部位におけるイントロンの挿入の結果として生じると考えられている。

【0178】本発明の熱安定性エンドヌクレアーゼは、このような活性が希望される遺伝子操作技術に使用することができる。

【0179】実施例11

IVS2を削除したT.リトラリスDNAポリメラーゼ発現ベクターの作製

他のアルファークラスのDNAポリメラーゼ類、及び、1170bpの介在配列中のエンドヌクレアーゼと比較してT.リトラリス遺伝子のアミノ酸配列を演繹して分析したところ、このイントロンはアルファポリメラーゼの領域Iを妨害することが示唆された。このエンドヌクレアーゼの前にある最初の3つのアミノ酸(Tyr Ala Asp)が、aa1472におけるThrに結合している場合には、良好な共通配列Iが確立される(下線を施した残基は相同性を示す)：

領域I：TYR GLY ASP THR ASP SER

左側の接合配列: TYR ALA ASP SER V
AL SER

右側の接合配列: VAL HIS ASN THR A
SP GLY

火道ポリメラーゼの領域 I: TYR ALA ASP
THR ASP GLY

この作製物を利用するために、以下に示すように、Lys 1076及びVal 1077のコドン用法を変化させることによりScaI部位をPCRプライマー内に作成した:

アミノ酸: PHE LYS VAL LEU
TYR ALA ASP

当初の配列: TTT AAG GTT CTT

変化させた配列: TTT AAA GTA CTT

ScaI部位: A GTA CT

発現プラスミドpAKK4を、以下に示す成分に由来する3方向連結法において作成した:

1) pPR969の約7959bpの断片を、HindIII及びEcoRIでの開裂により誘導化した。9μのpPR969DNAを、40単位のHindIIIエンドヌクレアーゼ及び40単位のEcoRIエンドヌクレアーゼを含む総量0.1mlの1×NEバッファー2を用いて37℃で1時間インキュベートした。開裂産物を、0.7%のGTG等級のアガロースゲル(FMC)上で、トリス-ホウ酸-EDTAバッファーを流して分離した。約8kbpの適切なバンドを、製造元の推薦する操作条件を利用して、エルトラップ溶出装置(シュレイカー アンド シューレ社)を使用しての電気溶出により単離した。溶出の後に、分画をエタノール沈殿により濃縮し、更に、アガロースゲル電気泳動における既知の重量標準物との比較により、回収率を定量化した。

【0180】2) ScaI及びEcoRI末端を有する約638bpの断片をPCR産物から誘導化した。この反応混合物は、1×NEB火道ポリメラーゼバッファー、0.1mg/mlのウシ血清アルブミン、0.2mMのdNTP(各ヌクレオチドが等モルである)、0.9μg/mlのpV174.1B1プラスミドDNA鋳型、及び、0.01A₂₆₀ U/mlのプライマー72-150(5' ATAAA GTACTTTTAAAGCCGAAC TTTTCTCTCTA3')、及び、プライマー「JACK」(5' CGGCGCATATGATACTGGACACTGATTAC3')を含んでいた。0.1mlの反応混合物を各々5本の試験管内に配し、更に、その試料をパーキン-エルマー社のサーモサイクラー(熱循環機)内で、3-5分間、95℃に加熱した。1Uの火道DNAポリメラーゼを各試験管に添加して、94℃-0.5分、50℃-0.5分、及び、72℃-2分からなる15周期を熱循環機内で行った。試料を一まとめにし、フェノール抽出し、更に、エタノール沈殿させた。試料を、50μlのトリス-EDTAバッファー中に懸濁させ、更に、4

0μlのdH₂O、10μlの10×NEバッファー3、60単位のScaIエンドヌクレアーゼ、及び、60単位のEcoRIエンドヌクレアーゼと混合した。37℃で1.75時間インキュベートした後、この反応産物を1.5%のアガロースゲル上で分離し、更に、約638bpの断片を電気溶出し、以下に示すように定量化した。

【0181】3) HindIII及びScaI末端を有する約358bpの断片をPCR産物から誘導化した。この反応混合物は、1×NEB火道ポリメラーゼバッファー、0.1mg/mlのウシ血清アルブミン、0.2mMのdNTP(各ヌクレオチドが等モルである)、0.9μg/mlのpV174.1B1プラスミドのDNA鋳型、及び、0.02 A₂₆₀ U/mlのプライマー698(5' GAGACTCGCGGAGAACTTGGACT3')、及び、プライマー73-143(5' TACAGTACTTTATGCGGACACTGACGGCTTTTATGCCAC3')を含んでいた。0.1mlの反応混合物を5本の試験管の各々の中に配し、更に、この試料をパーキン-エルマー社のサーモサイクラー内で3-5分間、95℃に加熱した。1UのベントDNAポリメラーゼを各反応試験管に添加し、94℃-0.5分、50℃-0.5分、及び、72℃-1分からなる20周期を、熱循環機上で行った。この試料を一まとめにし、フェノール抽出し、更に、エタノール沈殿させた。この試料を50μlのトリス-EDTAバッファー中に再懸濁し、更に、HindIII及びScaIエンドヌクレアーゼで開裂した。この反応産物を1.5%のアガロースゲル上で分離し、更に、358bpの断片を電気溶出し、以下に示すように定量化した。

【0182】この結合連鎖反応物は、約1μg/mlの、先に記載したpPR969断片、0.8μl/mlの、先に示した638bpの断片、0.4μl/mlの、先に示した358bpの断片、1×NEB結合連鎖反応バッファー、及び、100、000単位/mlのT4DNAリガーゼを含んでいた。結合連鎖反応は、16℃で5時間行った。先に示したように、正しく作成された組み換え体をScaI消化パターンにより同定し、更に、BL21(DE3)plysS内に形質転換させて誘導可能な活性をスクリーニングした。このような2種類の単離物であるpAKK4及びpAKK15を、この次の研究に使用した。これら2種類の単離物は、それらを独立した単離物から単離したにもかかわらず、同一であるように思われる。

【0183】新しい作製物であるpAKK4からの発現は、1170bpのイントロンからのエンドヌクレアーゼの発現を伴わないpPR969に比べて、3-10倍多いT₇リトリスDNAポリメラーゼを産生するに思われる。

【0184】T₇リトリスポリメラーゼのエキソヌクレアーゼ欠損変異体の産生のための発現ベクターは、pAKK15からの1417bpのClaI-SphI断片を、元来のエキソヌクレアーゼ欠損T₇リトリスDNAポリメラー

ぜ作製物であるpCBA1からの疑似的な1417bp断片で置換することにより作製した。このような組み換え体の一つをpAKM8と命名し、更に性質を分析した。

【0185】実施例12

ピロコッカス・スピーシス (Pyrococcus species) から熱安定性DNAポリメラーゼの精製

ピロコッカス sp. (Pyrococcus sp.) 株のGB-D (ATCC No. 55239) を、8本の1リットル用ビン中で、10g/lの必須イオウを含む、Belkin, et al.、上述、に記載されている培地中で、94℃において2日間増殖させた。この細胞を室温に冷却し、デカンテーションにより未使用のイオウから分離し、遠心により回収し、更に、-70℃に保存した。細胞の回収率は、リットル当たり1.4gであった。

【0186】先に記載したように取得された11.5gの細胞を、0.1MのNaClを含む28mlのバッファーA (10mMのKPO₄ バッファー、PH7.4; 0.1mMのEDTA、1.0mMのベーターメルカプトエタノール) 中に懸濁した。この溶菌液を、4℃において15,000gで30分間遠心した。上清溶液を、18mlのアフィゲルブルーカラム (パイオラド社) に通した。その後、このカラムを、0.1MのNaClを含む50mlのバッファーAで洗浄した。このカラムを、バッファーAに含まれる0.1から2.0MのNaClの300mlの直線濃度勾配液で溶出した。DNAポリメラーゼは約1.3MのNaClにおける単一のピークとして溶出され、これは、カラムに供した活性の90%を示した。DNAポリメラーゼのピークの活性 (25ml) を100mMのNaClを含む1リットルのバッファーAに対して透析し、その後、100mMのNaClを含むバッファーAで平衡化した15mlのフォスフォセルロースカラムに供した。このカラムを100mMのNaClを含む50mlのバッファーAで洗浄し、更に、酵素活性を、バッファーAに含まれる0.1から1.0MのNaClの200mlの直線濃度勾配液で溶出した。活性は0.6MのNaClにおける単一のピークとして溶出され、カラムに供した活性の70%を示した。一まとめにした活性 (42ml) を500mlのバッファーAに対して透析し、更に、25mlのDEAEカラムに供した。このカラムを、0.1MのNaClを含む50mlのバッファーAで洗浄し、酵素活性の3分の2がカラムを通過した。活性分画を一まとめにし (30ml)、更に、1.0mlのHPLCモノーSカラム (ファルマシア社) に供し、0.05から1.0MのNaClがバッファーA中に含まれる100mlの直線濃度勾配液で溶出した。活性は、0.22Mにおける単一のピークとして溶出され、カラムに供した活性の80%を示した。

【0187】精製したピロコッカス sp. ポリメラーゼをSDS 10-20%ポリアクリルアミドゲル内で電気泳動し、更に、蛋白質を検出するために以前に記載

したクマーシーブルーあるいはコロイド染色 (ISSブルー) のいずれかで染色した。微かに染色された蛋白質のバンドが、約92,000から97,000ダルトンにおいて観察され; この分子量を、以下に示すマーカー蛋白質類 (ベセスダ リサーチ ラボラトリーズ社) の移動に対する同一ゲル上での比較により取得された: ミオシン、200,000ダルトン; フォスホリラーゼB、97,400ダルトン; BSA、68,000ダルトン; オバルブミン、43,000ダルトン; カルボニックアンヒドラーゼ、29,000ダルトン; b-ラクトグロブリン、18,400ダルトン; リゾチーム、14,300ダルトン。

【0188】実施例13

ピロコッカス sp. DNAポリメラーゼ遺伝子のクローニング

T. リトラリスDNAポリメラーゼ遺伝子から調製された放射性プローブを使用するピロコッカスゲノムDNAライブラリーのクロスハイブリッド形成は、ピロコッカスDNAポリメラーゼをコードするDNAの同定及び単離を考慮してのことである。これは、以下に示すように実行した。

【0189】ピロコッカスゲノムライブラリーの調製においてどの制限酵素が最も有用であるかを決定する目的で、ピロコッカス sp. DNAを、EcoRI、BamHI、及び、HindIIIで完全に切断した。このDNAを、アガロースゲル電気泳動 (Fig. 13A)、及び、以下に示す用に調製したDNAプローブを使用するサザンハイブリッド形成 (Fig. 13B) に供した。市販のランダムライミングキット (ニューイングランド バイオラボズ社) 内における鋳型として、T. リトラリスDNAポリメラーゼ遺伝子 (bp 1-1274、バクテリオファージNEB #618から取得することができる、ATCC No. 40794) の最初のEcoRI断片の1μgを含む反応混合物を、37℃で1時間インキュベートして、高い特異的活性のDNAプローブを作製した。このプローブを、中程度の緊縮条件下において先に調製したピロコッカス sp. のDNAに対してハイブリッド形成させた (ハイブリッド形成: 50℃で一晩、4×SET、0.1Mのリン酸ナトリウム、pH7、0.1%のピロリン酸ナトリウム、0.1%のSDS、1×デンハース溶液; 洗浄条件: 3×20-30分の洗浄、45℃、0.1×SET、0.1Mのリン酸ナトリウム (pH7)、0.1%のピロリン酸ナトリウム、0.1%のSDS。Maniatis, et al.、上述)。約5kbにおける単一の主要なバンドがBamHIで切断したピロコッカスDNA中に検出された。EcoRI及びHindIIIは、このプローブを使用すると複数のバンドを生じ、これらの酵素はピロコッカスポリメラーゼ遺伝子でないを切断することを示している。

【0190】これらの結果に基づき、ファージベクター

λ DASH (ストラタジーン社) を使用して BamHI ゲノムライブラリーを作製した。ピロコッカス DNA の部分的及び完全な BamHI 消化物を調製した。部分的及び完全に BamHI 消化した DNA の混合物を、λ DASH の BamHI v 部位内へ結合させた。この結合混合物を製造元の説明書に従って、ギガバックゴールド (ストラタジーン社) を用いて封入し、大腸菌 E R 1 4 5 8 上で平板培養した。封入したファージライブラリーは、ml 当たり 1×10^6 のファージを含んでいた。

【0191】 T. リトラリス DNA ポリメラーゼ遺伝子 (NEB # 619 から取得できる、ATCC No. 40795) の3つの断片 (bp 1-1274、1656-2660、及び、3069-3737) の³²P-ラベルした DNA プローブを、市販のプライマーキット (ニューイングランド バオラボズ社) を使用して調製した。Benton & Davis (Maniatis, et al., 上述) の方法に従い、先に記載したハイブリッド形成条件を使用してピロコッカスのゲノムライブラリーをスクリーニングするのにこのプローブを使用した。このブランクの約1パーセントは陽性であり、10個の陽性ブランクを選択し、再感染により精製し、更に、3回平板培養した (各単離物について、90-100%のブランクが陽性になるまで)。大量のファージを各単離物から調製し、大腸菌を感染するのに用いた。具体的には、ファージのプレート溶菌液 (Maniatis et al., 上述) を各単離物から調製し、大腸菌細胞を感染するのに使用した。0.1mlの各プレート溶菌液を0.2mlの細胞 (OD₆₀₀ = 2) を含む大腸菌と混合した。この細菌性細胞を溶菌直前に収集し、0.05M の NaCl、0.01M のトリス (pH 8.0)、0.1mM の EDTA、0.1% の Triton X-100、及び、200 µg/ml のリゾチム (細胞の容量当たり3倍の容量) 中に懸濁し、更に、約1分間もしくは細胞溶菌が起こるまで37℃に加熱した。この溶菌化した抽出物を直ちに75℃で30分間加熱し、遠心し、更に、先に記載した方法に従い、その上清溶液を熱安定性 DNA ポリメラーゼについてアッセイした。10種類の単離物の内の3種類が有意なポリメラーゼ活性を示し、最も高い活性を示したクローン (B9) を更に調査した。

【0192】 ファージ DNA を B9 から単離し、挿入 DNA を制限酵素消化により調査した。SalI での消化により、2本の λ DASH と 15 kb の挿入断片とを生じた。BamHI での消化により、2本の λ DASH と 7、4、8、及び、3 kb の3つの挿入断片を生じた。これらの断片の各々をアガロースゲル電気泳動により精製し、溶出し、更に、pUC19 の BamHI 部位に結合した。この結合混合物を使用して大腸菌 E R 2207 を形質転換させたが、この大腸菌は、プラスミドが挿入断片を含む場合には白色のコロニーを生じ、かつ、標識としてのアガロース培地 (X-gal と IPTG) 上に挿入断片が存在

しなければ、青色のコロニーを生じる。7 kb の断片では白色の形質転換体は取得されなかった。4.8 kb の断片では3個の白色、及び、27個の青色形質転換体を取得され、更に、3 kb の断片では、20個の白色、及び、21個の青色形質転換体を取得された。3個の4.8 kb の白色コロニー形質転換体の全ては熱安定性 DNA ポリメラーゼ活性を発現した。3 kb の断片での形質転換体のいずれも、熱安定性ポリメラーゼ活性を発現しなかった。4.8 kb のピロコッカス DNA 断片を保持するこの3つのクローンは、全て、熱安定性 DNA ポリメラーゼについて、ほぼ同じ特異活性を有し、一つのを更に進んだ研究のために選択した (NEB # 720)。NEB # 720 と表示されるこのクローンを、1991年10月1日に、アメリカン タイプ カルチャー コレクションに寄託し、受託番号 ATCC No. 68723 となった。ピロコッカス s.p. DNA ポリメラーゼ遺伝子を含む、4.8 kb の BamHI 断片の制限エンドヌクレアーゼ地図を Fig. 14 に示した。bp 363 におけるポリメラーゼ遺伝子の出発点、及び、介在ヌクレオチド配列 (bp 1839-3420) の一部分を含むピロコッカス s.p. DNA ポリメラーゼ (NEB 720) をコードする部分的な DNA ヌクレオチド配列を Fig. 18 に示す。NEB # 720 は細胞のグラム当たり 1700 単位の DNA ポリメラーゼ活性を産生し、更に、これをこの酵素の大量調製に使用した。

【0193】 ピロコッカス s.p. DNA ポリメラーゼのクローンの一部分の配列を決定した (Fig. 18、bp 1-3420)。ピロコッカス s.p. DNA ポリメラーゼの配列は、DNA 及び蛋白質レベルの両方において、T. リトラリス DNA ポリメラーゼに非常に類似している (類似性は、GCG ベストフィットプログラムを使用して算出した、Smith and Waterman, Advances in Applied Mathematics、2:482 (1981))。総体的に、その遺伝子は、成熟した DNA ポリメラーゼのアミノ末端領域 (ピロコッカス s.p. の DNA ポリメラーゼにおける bp 363-1838) においては、69% の相同性で 66% が相同であり、かつ、現在までに配列決定されている IVS1 の一部分 (ピロコッカス s.p. の DNA ポリメラーゼにおける bp 1839-3420) において 63% が相同である。上流領域 (ピロコッカス s.p. の DNA ポリメラーゼにおける bp 1-362、Fig. 18、及び、T. リトラリス DNA ポリメラーゼにおける bp 1-290、Fig. 6) は、ベストフィットプログラムによると何の類似性も示していない。

【0194】 蛋白質レベルにおける類似性はより高めでさえる。ピロコッカス s.p. DNA ポリメラーゼのコーディング領域の 1019 個のアミノ酸においては、この2種類のポリメラーゼは、83% の類似性及び 68% の相同性を有する (Fig. 19)。成熟したポリメラーゼのアミノ末端及び IVS1 へと分割した場合、ポリメ

ラーゼのコーディングエキソンは、介在配列よりもより類似しており、成熟したポリメラーゼのアミノ末端（ピロコッカス *s p.* DNAポリメラーゼにおける aa 1-492）は89%類似しておりかつ78%相同であり、更に、IVS1（ピロコッカス *s p.* のDNAポリメラーゼにおける aa 493-1019）は78%類似しておりかつ60%相同である。

【0195】実施例14

DNAレベルにおける古細菌DNAポリメラーゼの類似性

T. リトラリスDNAポリメラーゼ遺伝子と、3種類の他の好熱性古細菌及びTaqのDNAからのDNAポリメラーゼ遺伝子との間のクロスハイブリッド形成の度合いを、サザンブロットハイブリッド形成（Maniatis、上述）により調査した。T. リトラリス及びピロコッカス *s p.*（株GB-D）、T. アクアチクス（*T. aquaticus*）、及び、他の2種類のピロコッカス株、G-1-J及びG-1-H、からの染色体DNAを、EcoRI もしくはBamHI のいずれかで開裂した。5 μ g の各DNAを、20単位のEcoRI エンドヌクレアーゼもしくは20単位のBamHI エンドヌクレアーゼを含む60 μ l の総容量の1×NEバッファー（EcoRI エンドヌクレアーゼのためのEcoRI バッファー、及び、BamHI エンドヌクレアーゼのためのBamHI バッファー+1×BSA）を用いて37℃で2時間インキュベートした。4重検証のため、開裂したDNAの各試料の0.75 μ g を、トリス酢酸EDTAバッファーで使用している1%のアガロース（シーケム LE社）ゲル上にのせて電気泳動させた（Maniatis、上述）。このゲルを、室温で20分間、臭化エチジウム（1 μ g/ml）で染色し、更に、定規を横においてゲルの写真を撮影した。

【0196】サザン（Maniatis、上述）により開発された方法を使用して、このDNAを、ゲルからニトロセルロース紙上に転移させた。ニトロセルロースフィルター紙（0.45 μ m）をゲルのサイズに切り、37℃において200mlの6×SSC（0.9MのNaCl、0.09Mのクエン酸ナトリウム）中に1時間を越える期間浸した。その間、ゲルを、200mlの0.25M 塩酸中で室温において15分間インキュベートし、その後、蒸留水ですすいだ。その後、ゲルを、200mlの0.5M 水酸化ナトリウム、1Mの塩酸ナトリウム中で、室温で30分間インキュベートし、その後、蒸留水ですすいだ。その後、ゲルを、200mlの1M トリスHCl、pH7.5、3Mの塩化ナトリウム中で、室温で30分間インキュベートした。ゲルからニトロセルロースへのDNAの転移を、18×SSC（2.7Mの塩化ナトリウム、0.27Mのクエン酸ナトリウム）、1Mの酢酸アンモニウム中で、4℃において行った。6時間後、ニトロセルロースを除去し、1×SSC（0.15Mの塩化ナトリウム及び0.015Mクエン酸ナトリウム）中

で、30秒間洗浄した。ニトロセルロースフィルターを空気乾燥させ、更に、その後、80℃で2時間より長い時間をかけて引圧乾燥させ、その後、室温に保存した。

【0197】T. リトラリスDNAポリメラーゼDNAのゲル精製した4種類の断片（5' ポリメラーゼコーディング領域を表すbp1-1274；3' ポリメラーゼコーディング領域を表すbp4718-5437；IVS1の一部分を表すbp2448-2882；及び、IVS2の一部分を表すbp3666-4242、からの1.3kbの α EcoRI断片、Fig. 6及び15）を、ニューイングランド バイオラボズ社のランダムプライマーキットを使用して放射能ラベルした。各35、5 μ l の容量である先の鋳型DNAの100ngを沸騰させた湯浴槽内で5分間沸騰させ、その後、氷上で5分間冷却し、遠心で沈殿化させた。鋳型DNAを、50 μ l の総容量中に含まれる1×ラベル用バッファー（ランダムなヘキサヌクレオチド類を含む）、1/10容量のdNTP混合物、25 μ Ciの α ³²P dCTP、及び、5単位のDNAポリメラーゼI-クレンウ断片を用いて37℃で1時間インキュベートした。この反応を0.018MのEDTAで停止した。プローブは、製造元の推薦する溶出条件に従い、エルutip ミニカラム（シュレイカー アンドシユール社）を用いて精製した。カウント総数を、全ての精製プローブについて算出した。1.3kbのEcoRI断片プローブ（bp1-1274）は 24×10^6 cpm、3'ポリメラーゼプローブ（bp4718-5436）は 22×10^6 cpm、IVS1プローブは 54×10^6 cpm、及び、IVS2プローブは 47×10^6 cpm を産生した。

【0198】ハイブリッド形成は、以下に示すように実行した（Maniatis、上述）。ニトロセルロースフィルターを、5mlのハイブリッド形成バッファー（0.75Mの塩化ナトリウム、0.15Mのトリス、10mMのEDTA、0.1%のピロリン酸ナトリウム、0.1%のラウリル硫酸ナトリウム、0.2%のウシ血清アルブミン、0.2%のフィコール400、0.2%のPVP、及び、100 μ g/mlの煮沸させたウシ胸腺DNA）中で、50℃において30分間インキュベートした。その後、各ニトロセルロースフィルターを、5mlのハイブリッド形成バッファー（0.03%のウシ血清アルブミン、0.03%のフィコール400、及び、0.03%のPVPを除いては先のものと同様）を含む別々のバッグ内へ入れた。各区分を、 $22-25 \times 10^6$ cpm の変成させたプローブと、50℃で一晩ハイブリッド形成させた。

【0199】ニトロセルロースフィルターをそのバッグから除去し、更に、0.1×SET Wash（15mMのNaCl、3mMのトリス塩基、0.2mMのEDTA、0.1%のSDS、0.1%のピロリン酸ナトリウム、及び、0.1Mのリン酸バッファー）を用いて、45℃

において3×30分インキュベートした。このフィルターを湿潤させたままに保ち、サランラップで包み、4時間から3日の範囲の様々な時間X線フィルムに露出した。

【0200】結果をFig. 16に示した。Fig. 6において、パートAからパートDは、4重検証したサザンブロットのオートラジオグラフィーである。ライン1-5はEcoRIで切断したDNA。ライン6-10はBamHIで切断したDNA。ライン1及び6はピロコッカス *s p.* のG-1-JのDNA；ライン2及び7はピロコッカス *s p.* のG-1-HのDNA；ライン3及び8はT. リトラリスのDNA；ライン4及び9はピロコッカス *s p.* のGB-DのDNA；ライン5及び10はT. リトラリスのDNA。ハイブリッド形成プローブは、以下に示すとおりである：パートA、T. リトラリスDNAポリメラーゼ遺伝子の5'コーディング領域、bp11274；パートB、T. リトラリスDNAポリメラーゼ遺伝子の3'コーディング領域、bp4718-5437；パートC、部分的なIVS2のプローブ、bp3666-4242；パートD、部分的なIVS2のプローブ、bp2448-2882。パートCとパートDの上段及び下段の写真は、各々、短時間及び長時間の露出の同一ブロットである。

【0201】4つのプローブのいずれもTaq DNAに対してはハイブリッド形成しなかった。両方のポリメラーゼのコーディング領域のプローブとも、サーモコッカス及びピロコッカスDNAの全てにおける特異的バンドに対してハイブリッド形成したが、Taq DNAに対してはハイブリッド形成しなかった。両方のプローブを使用して良好なシグナルが取得され、これは、T. リトラリスDNAポリメラーゼのコーディング領域のアミノ及びカルボキシ末端の両方が強く保存されていることを示している。T. リトラリス及びピロコッカス *s p.* のGB-Dのアミノ末端領域は約69%相同であり（例えば、Fig. 6及び18を参照せよ）、かつ、蛋白質レベルにおいて非常に類似している（Fig. 19）。IVS1のプローブは、T. リトラリス及びピロコッカス *s p.* GB-DのDNAに対して強くハイブリッド形成し（1582bp領域について約63%相同）、かつ、ピロコッカス *s p.* G-1-HのDNAに対しては弱くハイブリッド形成した。IVS2プローブは、T. リトラリスDNAに対しては強力にハイブリッド形成し、かつ、ピロコッカス *s p.* G-1-HのDNAに対しては弱くハイブリッド形成した。

【0202】実施例15

抗体レベルにおける古細菌DNAポリメラーゼの類似性
T. リトラリス、及び、ピロコッカス株の1mlの培養物からのペレットを、100μlの尿素溶菌バッファー（4Mの尿素、0.12Mのトリス、4%のラウリル硫酸ナトリウム、10%のβ-メルカプトエタノール、2

0%のグリセロール、及び、0.002%のプロモフェノールブルー）中に再懸濁し、更に、3分間煮沸した。煮沸した試料を25G5/8の注射針で剪断して試料の粘性を低減させた。T. リトラリス、及び、ピロコッカス株G-1-J及びG-1-Hの試料、及び、精製したTaq DNAポリメラーゼ、大腸菌のDNAポリメラーゼ、及び、ピロコッカス *s p.* (GB-D)から精製したDNAポリメラーゼの試料の2重検証としてのそれぞれ10μlを10-20%のSDS-PAGEゲルにのせ、蛋白質流出バッファー（0.1%のラウリル硫酸ナトリウム、0.19Mのグリシン、及び、0.025Mのトリス塩基）中で流出させた。ニトロセルロースフィルター（45μm）を上流水中に5分間浸し、その後、転移バッファー（0.15%のエタノールアミン、20mMのグリシン、及び、20%のメタノール）中に30分間浸した。ゲル上の蛋白質を転移バッファー（Townin, et al., PNAS (1979) 76: 4350-4354）中で、ニトロセルロースフィルター上に電気溶出させた（30ボルト、4℃で一晩）。

【0203】ニトロセルロースを除去し、ボールペンで印を付け、TBSTT（20mMのトリス、150mMの塩酸ナトリウム、0.2%のTween20、及び、0.05%のTritonX-100）中で5分間洗浄した。このフィルターをTBSTT+3%の脱脂粉乳（カーネーション社）中で30分間遮断し、3×3分間TBSTT内で洗浄した。坑-T. リトラリスDNAポリメラーゼ抗血清を部分的に精製した天然のDNAポリメラーゼ調製物に対して作成した。T. リトラリスDNAポリメラーゼ特異血清を、精製した天然酵素のウエスタンブロット切片上における親和性を利用する精製法により調製した（Beall et al., J. Immunological Methods 86:217-233 (1983)）。親和性を利用して精製した坑-T. リトラリスDNAポリメラーゼマウス抗体（V76-2+3）及び、モノクローナルな坑-Taqポリメラーゼ抗体（TBSTT中において1:100に希釈したもの）を、各ニトロセルロースフィルターに対して別々に、室温において5時間添加した。このフィルターをTBSTTで3×3分洗浄し、その後、アルカリフォスファターゼ（プロメガ社）と複合化させた坑-マウス2次抗体の1:7500希釈物と、TBSTT中で、室温において1時間反応させた。このニトロセルロースフィルターを、製造元（プロメガ社）による指示通りに、NBT/BCIPで展開した。Taqモノクローナルを使用した結果をFig. 17に示した。Fig. 17は、親和性を利用して精製した坑-T. リトラリスDNAポリメラーゼ抗体（パートA）、及び、坑-Taq DNAポリメラーゼモノクローナル抗体（パートB）と反応させた、T. リトラリス（V）、ピロコッカス *s p.* G-1-J（J）、及び、ピロコッカス *s p.* G-1-H（H）からの未精製溶菌液類、あるいは、ピロコッカス

s p. GB-D (DV)、T. アクアティクス (T)、もしくは、大腸菌 (E) からの精製したポリメラーゼ類のウエスタンブロットである。矢印は、T. リトラリス及びピロコッカス s p. DNAポリメラーゼ蛋白質の位置を示す。パートBにおける反応性はバックグラウンド蛋白質に対するものであり、パートAにおいて見られるように、DNAポリメラーゼに対するものではない。

【0204】Taq DNAポリメラーゼに対して特異的なモノクローナル抗体は、テストしたピロコッカス及びセルモコッカス株からの蛋白質とは交差反応しない。

【0205】しかしながら、T. リトラリス及び3種類のピロコッカス株からの、90-95, 000ダルトンのDNAポリメラーゼ蛋白質は、親和性を利用して精製した抗-T. リトラリスDNAポリメラーゼ抗体と反応した。これは、T. リトラリス及びピロコッカス s p. GB-DのDNAポリメラーゼの間の高度な類似性及び相同性の両方を考えれば、驚くべきことではない (Fig. 19)。

【0206】Fig. 19は、組換えT. リトラリスの演繹したアミノ酸配列の一部分と、組換えピロコッカス s p. DNAポリメラーゼの部分的配列の比較である。ピロコッカスDNAポリメラーゼの演繹したアミノ酸を上列に記載し、組換えT. リトラリスDNAポリメラーゼの演繹したアミノ酸配列を下列に記載してある。総同性を垂直な実線により示し、類似性を1つもしくは2つの点で示し、非保存的置換はこの2つの配列間を空白にして示してある。

【0207】実施例16

標的古細菌から組換え熱安定性DNAポリメラーゼを取得する目的で、標的DNAポリメラーゼ遺伝子をクローニングするための様々な基本的方法を行うことができる。初めには、本発明の実施例15において記載されているように、抗-Taq DNAポリメラーゼもしくは抗-T. リトラリスDNAポリメラーゼ血清を使用する、精製したポリメラーゼ（未精製のポリメラーゼ溶菌液も感度が低減するが使用することができる）のウエスタンブロット分析により、新しいポリメラーゼがPOL α もしくはPol I 類の一員であるかどうかを免疫学的に決定する一ことを試みる (Fig. 17)。新しいポリメラーゼが抗-Taq ポリメラーゼモノクローナルと反応する場合には、T. リトラリスDNAポリメラーゼから作製された試薬を使用しては、恐らく簡単にはそれをクローン化することはできない。新しいポリメラーゼが抗-T. リトラリス血清と交差反応する場合には、以下に示す方法でそれをクローン化することができるはずである。新しいポリメラーゼがいずれの血清とも反応しない場合には、この実験は結論を得ることができないものと考えて、次の段階であるDNAクロスハイブリッド形成へ進むべきである。

【0208】至適プローブとDNAとのハイブリッド形成条件を、各新しい生物について実験的に決定する必要がある。同時に、T. リトラリスプローブに対してハイブリッド形成しかつ新しいポリメラーゼを充分コードするほど長い断片を産生する酵素を発見する目的で、新しい生物からの様々な制限消化をテストする。

【0209】プローブ選択は、T. リトラリスDNAポリメラーゼ遺伝子のサイズ及び領域に関連して変化することがある。至適プローブを、大きめもしくは小さめのDNA断片、あるいは、オリゴマーさえ用いる、以下に記載するような試験的なサザンブロットを行うことにより決定することができる。IVS配列内に含まれるものに完全に由来するプローブを選択して、新しい古細菌DNAポリメラーゼ遺伝子内のIVSの存在を探索することができるか、あるいは、プローブは成熟したポリメラーゼコーディング領域に限定されている可能性がある。プローブとして完全なT. リトラリスDNAポリメラーゼ遺伝子を使用することには数々の長所及び短所がある。主要な短所は、プローブが大きければ大きいほど、非常に低い緊縮度において見せ掛けのハイブリッド形成を産生しやすくなることである。より大きいプローブを使用することの利点には、(1) それらが、ポリメラーゼのある小さな部分において、T. リトラリスDNAポリメラーゼ遺伝子から主に分岐してきた他のポリメラーゼに対してクロスハイブリッド形成をよりしやすいこと、及び、(2) プローブがT. リトラリスDNAポリメラーゼ遺伝子のアミノ及びカルボキシ末端にまたがるため、それらは、新しいポリメラーゼ遺伝子内に存在する内側の制限部位を検出しやすいことである。プローブ選択の最初の段階においては、様々な制限酵素を使用して、新しい古細菌からのDNAを開裂し、T. リトラリスDNAポリメラーゼプローブに対してハイブリッド形成しかつ新しいポリメラーゼを充分コードするほど長い、好ましくは一つもしくはせいぜい2つのバンドを産生する、一つもしくは複数の酵素を発見することが重要である。新しいポリメラーゼに必要な最小のコーディング配列を、ウエスタンブロットにより（希望であれば、IVSについての因子を仮定して）、あるいは、最初の近似として4KBを上回るものを推測することにより決定される新しいポリメラーゼのサイズから概算することができる。最大断片サイズは、希望するベクターのクローニング能により限定される。

【0210】至適ハイブリッド形成条件は、様々な洗浄温度において試験的なサザンブロットを行うことにより実験的に決定する。ハイブリッド形成は、50℃において、4×SET、0.1Mのリン酸ナトリウム、pH 7、0.1%のピロリン酸ナトリウム、0.1%のSDS、1×デンハート溶液中で行うが、任意の低緊縮性ハイブリッド形成条件も適当である (Maniatis)。洗浄条件は、37-55℃まで変化し、3×30分、0.1×

SET洗浄液(15mMのNaCl、3mMのトリス塩基、0.2mMのEDTA、0.1%のSDS、0.1%のピロリン酸ナトリウム、及び、0.1mMのリン酸バッファー)を用いるが、任意の低緊縮性洗浄条件を使用することもできる。本実験パートの要点は、プローブをハイブリッド形成させ、更に、サザンブロットを低緊縮度で洗浄して、非特異的クロスハイブリッド形成を含むことさえあるクロスハイブリッド形成のある程度のレベルを保証することである。次には、洗浄の緊縮度を上昇させるが、それは例えば、洗浄温度を3-5℃増大させ、その後、オートグラフィー上のシグナルの減少により決定されるハイブリッド形成したプローブの消失を記録する。最初には、低緊縮度においてプローブに対してハイブリッド形成している多数のバンドを観察することが期待される。洗浄の緊縮度を増大させるにつれて、弱くハイブリッド形成している配列が解離し、オートラジオグラフから消失する。洗浄の緊縮度を増大させるにつれて、一本もしくは数本のみのバンドが依然としてプローブに対してハイブリッド形成するところで条件が確立する。これらがこれからの実験において使用すべき条件である。緊縮度がこの点を越える時点で全てのハイブリッドシグナルが消失する。目的は、全てのハイブリッド形成シグナルが消失前、消化物当たり一本もしくは数本のバンドが依然としてハイブリッド形成する最も緊縮度の高い条件を決定することである。

【0211】巨大なT. リトラリスDNAポリメラーゼ遺伝子断片を用いる最初のプローブ選択が、どのようなハイブリッド条件を用いても鮮明なパターンを生じない場合には、プローブサイズとハイブリッド形成条件の良好な協関係が得られるまで小さなプローブをテストすることができる。それに代わる方法として、本発明の実施例14は、T. リトラリスDNAポリメラーゼ遺伝子(アミノ末端、IVS1、IVS2、及び、カルボキシ末端、Fig. 15及び16)の様々な領域に広がる多数の断片を、別々ではあるが、同時に並行してテストするサザンブロットに使用することができることを示している。

【0212】至適制限消化物でライブラリーを作製し、更に、至適化させたプローブとハイブリッド形成させる。並行して行われる方法は、発現ベクター内へクローン化させ、更に、坑-T. リトラリス抗血清で直接スクリーニングすることである。いずれかのプライマー法が、活性もしくは不活性産物を産生することができる。活性ポリメラーゼが検出されない場合には、挿入断片のサイズ及び坑-T. リトラリス血清に対する反応性についてそのクローンをチェックする。坑-T. リトラリス血清に対する反応性が何ら存在しない場合には、ポリメラーゼは、大腸菌内におけるそれ自身の調節配列からは発現されないことがあってよく、かつ、プラスミド挿入断片の配列を決定して、大腸菌のプロモーター及び恐ら

くは翻訳シグナルに対して新しいポリメラーゼを遺伝子操作を利用して結合する必要がある。

【0213】本発明において我々は、T. リトラリス及びピロコッカス sp. DNAポリメラーゼ遺伝子の両方におけるPol α 保存領域モチーフ内のイントロンもしくは介在配列を同定した。そのため、我々は、他の古細菌DNAポリメラーゼ遺伝子が保存されているモチーフ内においてもイントロンを有することができると予測している。新しいポリメラーゼクローンが不活性である場合、介在配列の存在についてチェックするべきである。これらのイントロンは2つの方法において同定することができる。これらのイントロンがT. リトラリス及びピロコッカス sp. のDNAポリメラーゼ遺伝子内に発見されるイントロンに関連している場合には、これらを、T. リトラリス及びピロコッカス sp. のDNAポリメラーゼ遺伝子のイントロン配列に由来するDNAプローブに対する、低緊縮度のハイブリッド形成により同定することができる。IVSが発見される場合、このクローンの配列を決定してIVSの除去のための対策を開発する。クローンが不活性であり、かつ、クロスハイブリッド形成するIVSが発見されない場合には、プラスミドの配列を決定して新しいIVSを探し出す。古細菌DNAポリメラーゼ遺伝子の配列をDNAレベルにおいて決定し、更に、その配列を、(1)他のDNAポリメラーゼと比較して非類似区分を同定し、(2)保存されているモチーフと比較して領域I-VIのうちの存在していないものを突き止め、次に、存在していない領域における分断点を同定する。一度同定しさえすれば、イントロンを、当業者に知られている任意の多数の技術により、インビトロにおいて除去することができ、これらの方法の内の幾つかは、T. リトラリスDNAポリメラーゼ遺伝子からのIVS1及びIVS2の除去に関する本方法内に記載されている。

【0214】最初のライブラリースクリーニングが、活性な熱安定性DNAポリメラーゼを合成するクローンを産生しないが、(1)DNAレベルにおけるクロスハイブリッド形成、(2)抗体レベルにおける交差反応性、及び、(3)DNA配列もしくは演繹したアミノ酸配列レベルにおける他のDNAポリメラーゼとの類似性、により決定される部分的な遺伝子クローンを結果として生じる場合、より多い量のゲノムサザンブロットを最初のクローンで探索して、次のライブラリーを作製するために選択すべき制限酵素を同定する。第2ライブラリーは、完全なポリメラーゼ遺伝子をより含んでいそうなより大きい断片を含むべきである。このライブラリーを、抗体、あるいは、好ましくは、最初の新しいポリメラーゼからクローン化した配列のいずれかを使用してスクリーニングする。結果として陽性になるものを熱安定性DNAポリメラーゼ活性についてチェックする。この第2回目において活性な熱安定性DNAポリメラーゼが検出

されない場合には、介在配列をクロスハイブリッド形成及びDNA配列決定によりスクリーニングすることができ、DNA配列決定によっても、ポリメラーゼの読み取り枠内において、全ての保存されたポリメラーゼモチーフ及び停止コドンの存在を立証することにより、果たしてそのクローン化した遺伝子が完成されたものであるか否かが示される。最終的に活性な熱安定性DNAポリメラーゼをクローニングする前には、数回のスクリーニング及び再スクリーニングが必要である。

【0215】先のスクリーニング及び再スクリーニング法は、遺伝子内に存在する毒性要素のために、新しい熱安定性ポリメラーゼ遺伝子をクローニングするのに十分なものでないことがあってよい。この場合には、DNAもしくは蛋白質レベルにおける交差反応性がクローニングの卓越した方法であり、それは、一部分のみの不活性産物を最初にクローニングすることができ、その後完全な遺伝子をクローニングすることができるためである。先に概要を記載した手法を使用しては、完全な遺伝子を取得することが簡単でない場合には、クローン化させる場合に非常に有毒であるIVS2のような介在配列の存在を探索すべきである。これは、ポリメラーゼクローン内の欠損及び配列転位の探索、あるいは、既知の有毒なT₇ リトリス配列の探索のいずれかにより行われる。2重検証でのサザンブロットをポリメラーゼのコーディング領域及びIVS配列で探索して、ポリメラーゼのコーディング領域に近位する有毒なIVSの位置を決定する。配列転位もしくは有毒なIVSを発見した場合、適切な対策は、最初に遺伝子操作を利用してポリメラーゼのアミノ末端を本出願において記載されているような強力に調節されている発原型に対して結合させることである。一度成功すれば、ポリメラーゼ遺伝子の残りの部分をクローン化し、更に、アミノ末端に接続して、T₇ リトリスIVS2配列のような有毒な要素の発現を低減させることができる。これに代わる方法として、ポリメラーゼ遺伝子のクロスハイブリッド形成させたサブフラグメントを単離し、ハイブリッド形成もしくはDNA配列決定によりIVSについてチェックすることができる。IVSは、当業者に知られている方法により、これらの領域からインビトロにおいて除去することができる。その後、有毒な要素を既に除去してあるサブフラグメントの結合により、完全なポリメラーゼ遺伝子を作製することができる。

【図面の簡単な説明】

【図1】 Fig. 1 Aは、実施例1のSDS-ポリアクリルアミドゲルの電気泳動の写真である。

【図2】 Fig. 1 Bは、Fig. 1 Aにおけるゲルのライン2から溶出された蛋白質のポリメラーゼ活性及びエキソヌクレアーゼ活性を示すグラフである。

【図3】 Fig. 2は、バクテリオファージNEB 619のBamHI断片内に完全に含まれるT₇ リトリスDNAポ

リメラーゼをコードする遺伝子を含むXba断片の制限部位地図である。

【図4】 Fig. 3 A及びFig. 3 Bは、それぞれ、天然及び組換えT₇ リトリスDNAの半減期を示すグラフである。

【図5】 Fig. 3 A及びFig. 3 Bは、それぞれ、天然及び組換えT₇ リトリスDNAの半減期を示すグラフである。

【図6】 Fig. 4は、T₇ リトリスDNAポリメラーゼ及びクレノウ断片の、デオキシヌクレオチドの存在もしくは不在に対する反応を示すグラフである。

【図7】 Fig. 5は、天然のDNA (NEB 619のBamHI断片) 及び大腸菌NEB 671とNEB 687におけるT₇ リトリスDNAポリメラーゼ遺伝子の体制を示す制限部位地図である。

【図8】 Fig. 6は、1.3 kb、1.6 kb、及び、1.9 kbのEcoRI断片、及び、EcoRI/BamHI断片の一部を含む、バクテリオファージNEB 619の1.4 kbのBamHI制限断片の部分的なヌクレオチド配列である。

【図9】 Fig. 6は、1.3 kb、1.6 kb、及び、1.9 kbのEcoRI断片、及び、EcoRI/BamHI断片の一部を含む、バクテリオファージNEB 619の1.4 kbのBamHI制限断片の部分的なヌクレオチド配列である。

【図10】 Fig. 6は、1.3 kb、1.6 kb、及び、1.9 kbのEcoRI断片、及び、EcoRI/BamHI断片の一部を含む、バクテリオファージNEB 619の1.4 kbのBamHI制限断片の部分的なヌクレオチド配列である。

【図11】 Fig. 6は、1.3 kb、1.6 kb、及び、1.9 kbのEcoRI断片、及び、EcoRI/BamHI断片の一部を含む、バクテリオファージNEB 619の1.4 kbのBamHI制限断片の部分的なヌクレオチド配列である。

【図12】 Fig. 6は、1.3 kb、1.6 kb、及び、1.9 kbのEcoRI断片、及び、EcoRI/BamHI断片の一部を含む、バクテリオファージNEB 619の1.4 kbのBamHI制限断片の部分的なヌクレオチド配列である。

【図13】 Fig. 7は、DNAポリメラーゼの共通相同領域IIIにおけるアミノ酸とT₇ リトリスの相同群IIIのアミノ酸との比較である。

【図14】 ベクターpPR969の説明図である。

【図15】 ベクターpCAS4の説明図である。

【図16】 ベクターVI74-1BIの説明図である。

【図17】 Fig. 11は、検出可能な3'から5'方向へのエキソヌクレアーゼ活性をもたない、実施例6において作製したT₇ リトリスDNAポリメラーゼ変異体を説明するグラフである。

【図18】 Fig. 12は、実施例IIIにおいて使用されるプライマーのヌクレオチド配列である。

【図19】 Fig. 13 Aは、EcoRI (ライン3)、BamHI (ライン4)、HindIII (ライン5) で切断したピロコッカス s p. DNAの、臭化エチジウムで染色したア

ガロースゲルの電気泳動の写真である。ライン1は、マーカーとしての、HindIIIで切断したλ DNAであり、ライン2は、マーカーとしてのpBI322である。Fig. 13 Bは、Fig. 13 Aにおける同一ゲルの、サザンハイブリッド形成のオートラジオグラフィーの電気泳動の写真である。³²P-DNAプローブは、T. リトラリスDNAポリメラーゼのアミノ末端部分をコードする、1.3 kbのEcoRI断片から調製した。BamHIで切断したピロコッカス sp. DNAがそのプローブで約4-5 kbの単一のバンドを生じることに注目せよ。HindIIIで切断したλ DNAの2.3 kbのバンドがフィルム上に示されるという事実は、そのバンド中に存在する大量のDNAに対する非特異的なハイブリッド形成のためである。プラスミドpBR322が照らしだされているという事実は、プローブ内の相同な配列のためである。

【図20】 Fig. 14は、大腸菌2270 (NEB#720)のpUC19プラスミド内のピロコッカス sp. DNAポリメラーゼを含む遺伝子を含む、4.8 kbのBamHI断片の制限部位地図である。

【図21】 Fig. 15は、他の標的古細菌についてのDNAの類似性を分析するために使用したプローブを説明している。

【図22】 Fig. 16は、T. リトラリス及びピロコッカス sp. のDNAに対してプローブがハイブリッド形成するが、T. アクアティクスのDNAに対してはハイブリッド形成しないことを説明する、実施例14において記載した4重検証のサザンブロットのオートラジオグラフィーの電気泳動の写真である。

【図23】 Fig. 16は、T. リトラリス及びピロコッカス sp. のDNAに対してプローブがハイブリッド形

成するが、T. アクアティクスのDNAに対してはハイブリッド形成しないことを説明する、実施例14において記載した4重検証のサザンブロットのオートラジオグラフィーの電気泳動の写真である。

【図24】 Fig. 17は、親和性を利用して精製した坑火道DNAポリメラーゼ抗体（パートA）、もしくは、坑-Taq DNAポリメラーゼ抗体（パートB）と反応させた、T. リトラリス (V)、ピロコッカス sp. G-I-J (J)、ピロコッカス sp. G-I-H (H)からの未精製溶菌液、あるいは、ピロコッカス sp. GB-D (DV)、T. アクアティクス (T)、もしくは、大腸菌 (E)からの精製したポリメラーゼのウエスタンブロットの電気泳動の写真である。矢印は、T. リトラリス及びピロコッカス sp. のDNAポリメラーゼ蛋白質の位置を示す。パートBにおける反応性はバックグラウンドの蛋白質に対するものであり、パートAにおいて示されるようなDNAポリメラーゼに対するものではない。

【図25】 Fig. 18は、ピロコッカス sp. DNAポリメラーゼをコードする遺伝子の部分的なDNAヌクレオチド配列である。

【図26】 Fig. 18は、ピロコッカス sp. DNAポリメラーゼをコードする遺伝子の部分的なDNAヌクレオチド配列である。

【図27】 Fig. 19は、T. リトラリスDNAポリメラーゼに対するピロコッカス sp. のDNAポリメラーゼの演繹したアミノ酸配列の比較である。

【図28】 Fig. 19は、T. リトラリスDNAポリメラーゼに対するピロコッカス sp. のDNAポリメラーゼの演繹したアミノ酸配列の比較である。

【図5】

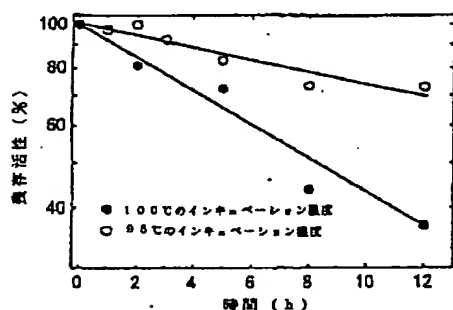
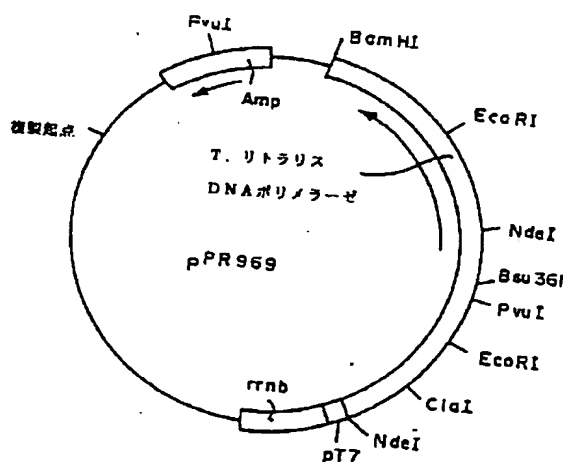
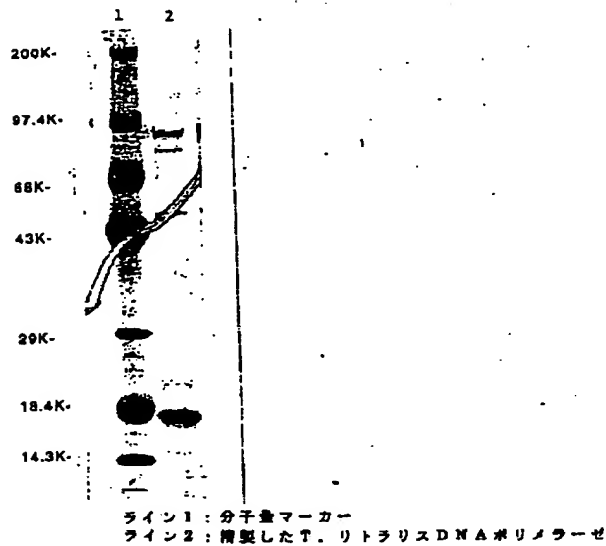


Fig. 3B

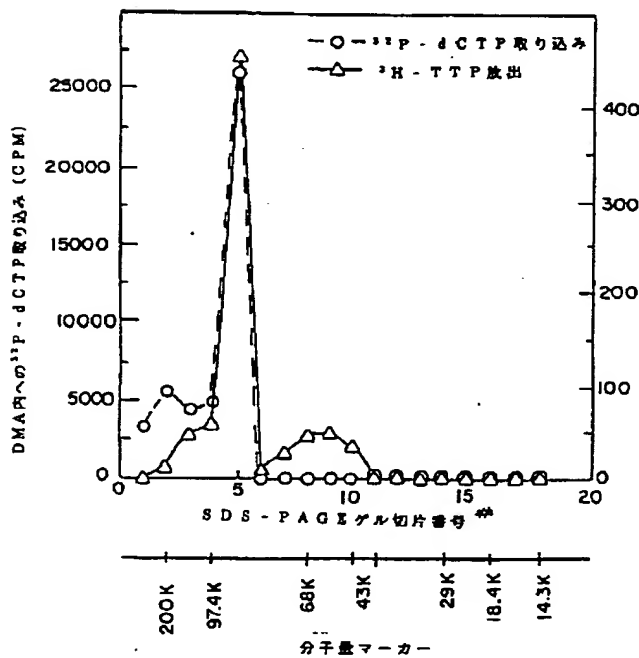
【図14】



【図1】

Fig. 1A 精製したT. リトラリスDNAポリメラーゼの
SDS-ポリアクリルアミドゲル

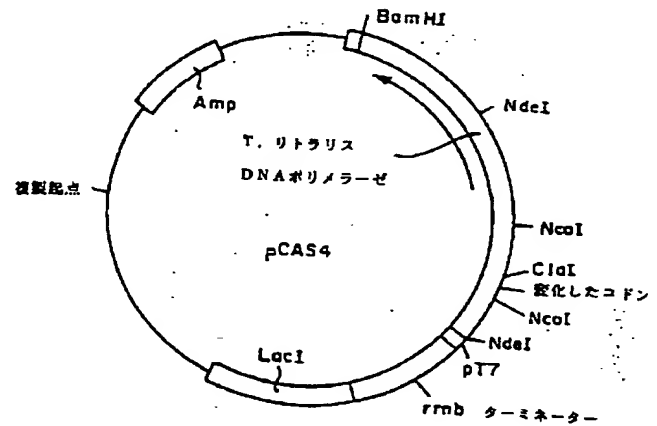
【図2】



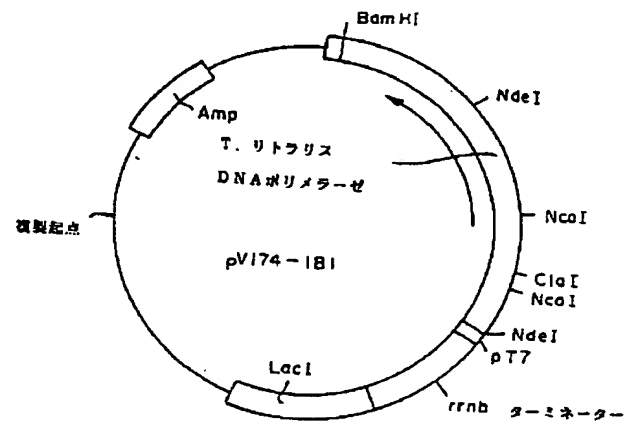
T. リトラリスDNAポリメラーゼ機能物質のサイズ決定

Fig. 1B

【図15】



【図16】



【図17】

3' から5' 方向へのエキソヌクレアーゼ活性を持たない
火道ポリメラーゼ変異体のアッセイ

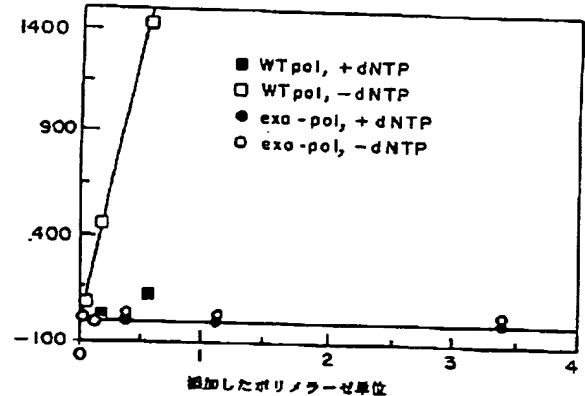
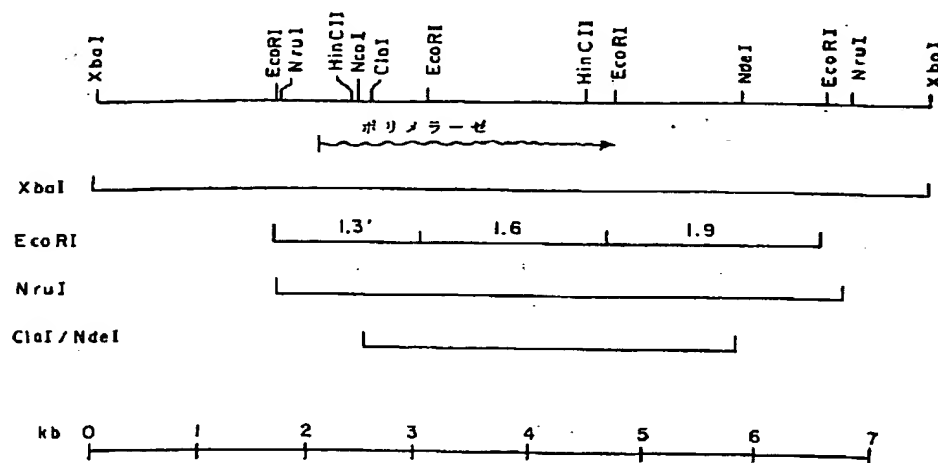


Fig. 11

【図3】

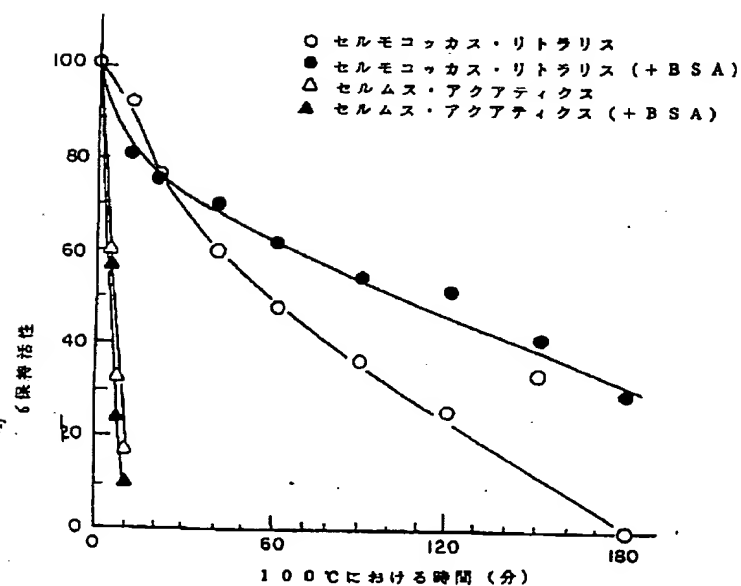
T. リトラリス DNA ポリメラーゼの地図



T. リトラリス DNA ポリメラーゼの近似断片サイズ及び位置

Fig. 2

【図4】



DNAポリメラーゼの熱安定性

Fig. 3A

【図19】

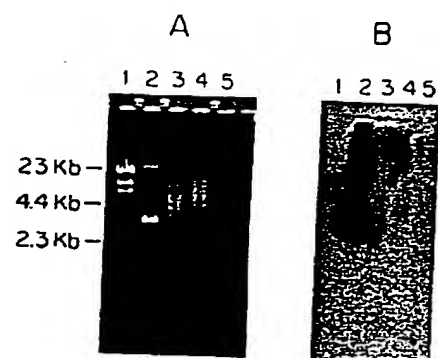


Fig. 13

【図6】

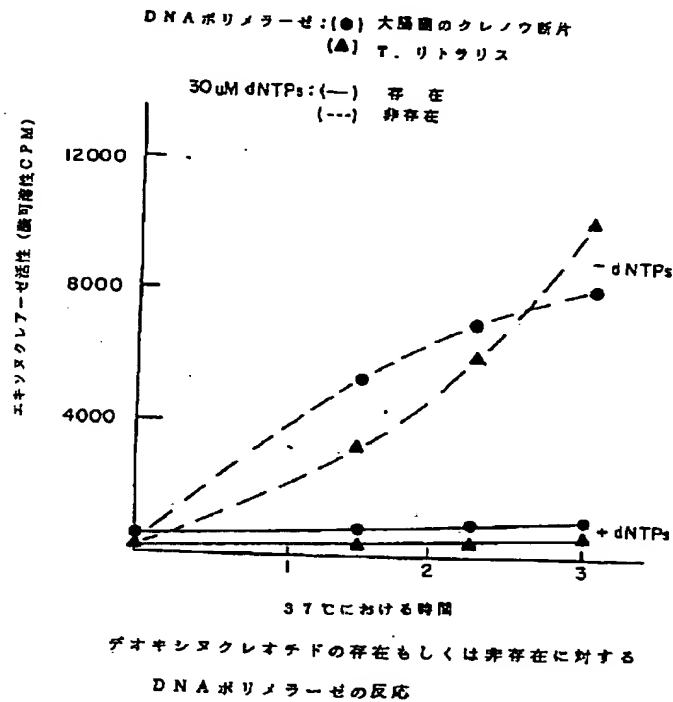


Fig. 4

【図20】

ピロコカス種DNAポリメラーゼ遺伝子領域

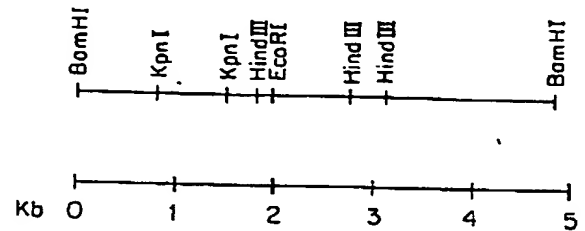


Fig. 14

【図21】

火道ポリメラーゼプロンプ

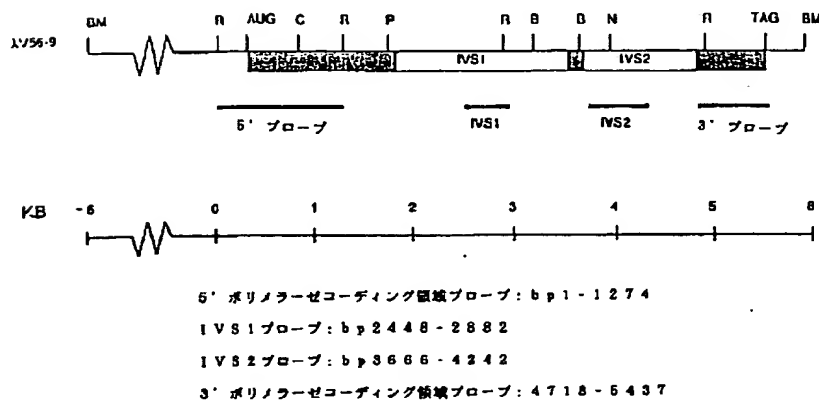
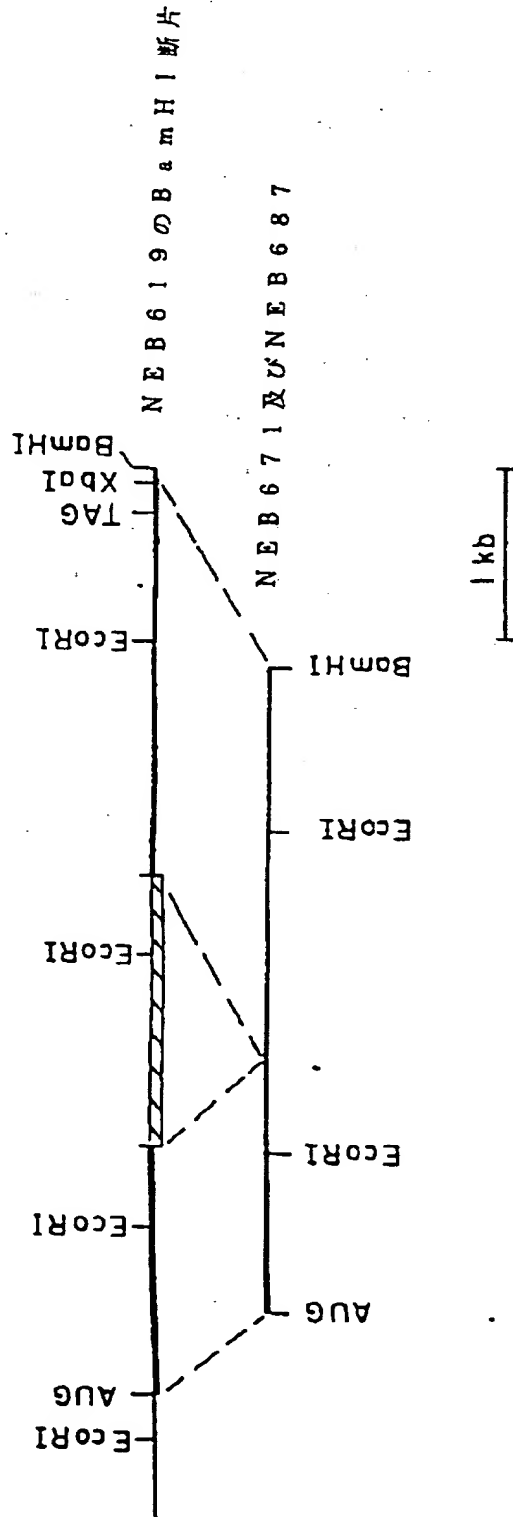


Fig. 15

【図7】

天然のDNA及びクローンNEB671とNEB687におけるT₇リトリスDNAポリメラーゼの体制



太線は、発現クローンNEB671とクローンNEB687中に存在するT₇リトリスDNAを表す。

波線は、クロニング接続部位を表す。

斜線を付けた四角は、欠失したイントロンを表す。

Fig. 5

[図8]

GAATTGOGA TAAATCTAT TTCTCTCTC CATTTTTC A TTCAAAAAC GTAAGCATGA	60
GCCAAAGCTC TGGGCTTTC TCTGTCTTC CCGCTAACCC TCTTGAAAAC TCTCTCCAAA	120
GCATTTTITG ATGAAAGCTC ACGCTCTCT ATGAGGGTCA GTATATCTGC AATGAGITOG	180
TGAAGGGTTA TTCTGTAGAA CAACTOCATG AATTTGCAAT TGGATGGGGG TTATAAAMTT	240
TGGGGAACT TTTATTTAAT TTGAAGTCA GTTATATCT GGTGGTATTT ATGATACTGG	300
AACTGATTA CATAACAAA GATGGCAAGC CTATTAATCG AATTTTAAAG AAAGAGAACG	360
GGGAGTTTAA AATAGAACTT GAGCTCAT TTTAGGCTA TATAATGCT CTCCTCAAG	420
ATGACTOOGC TATTGAGGAG ATAAAGGCAA TAAAGGGCGA GAGACATGA AATACTGTGA	480
GAGTGTCTGA TGCAGTGAAA GTCAAGGAAA AATTTTGGG AAGGGAAGTT GAAGTCTGGA	540
AGCTCATTTT CGAGCATOCC CAGAGCTTC CAGCTATGG GGGCAAAATA AGGGACATC	600
CAGCTGTGGT TGACATTTAC GAATATGACA TACCTTTTC CAAGGTTAT CTCATAGACA	660
AGGGCTTGAT TCCATGGAG GGAGAGGAG AGCTTAAGCT OCTTGCTTT GATATTGAAA	720
CGTTTATCA TGAGGGAGAT GAATTTGGAA AGGGGAGAT AATAATGATT AGTTATGOOG	780
ATGAAGAAGA GGCCAGAGTA ATCAGTGA AAAATATOGA TTTGCGTAT GTGATGTG	840
TGTCCAATGA AAGAGAAATG ATAAAGGTT TTGTCAAGT TGTTAAAGAA AAAGACCCCG	900
ATGTGATAAT AACTTACAAT GGGGACAAT TTGATTGOC GTATCTATA AAACGGGCAG	960
AAAAGCTGGG AGTTGGGCTT GTCTTAGGAA GGGACAAAGA ACATCCCGAA CCGAGATTC	1020
AGAGGATGGG TGATAGTTTT GCTGTGAAA TCAAGGTAG AATCCACTTT GATCTTTTC	1080

Fig. 6

[図9]

CAGTTGTGGG AAGGAGATA AACCTCCAA CGTATACGCT TGAGGCAGTT TATGAAGCAG	1140
TTTTAGGVA AACCAAMGC AATTAGGAG CAGAGGAAT TCCCGCTATA TGGGAACAG	1200
AAGAAAGCAT GAAAAACTA GOCAGTACT CAATGGAAGA TGCTAGGGCA ACGTATGAGC	1260
TOGGGAAGGA ATTCTTCCC ATGGAAGCTG AGCTGGCAA GCTGATAGGT CAAAGTGTAT	1320
GGGAGTCTC GAGATCAAGC AOCGGCAAC TCGTGGAGTG GTATCTTTTA AGGGTGGCAT	1380
ACGGAGAGAA TGAAGTTGA CCGAACAAAC CTGATGAGGA AGAGTATAAA CGGCGCTTAA	1440
GAACAACTTA CCGGGAGGA TATGTAAAG AGCAGAAA AGGTTTGTGG GAAAATATCA	1500
TTTATTTGGA TTTCGCAGT CTGTACCTT CATTATAGT TACTCACAC GATCCCCAG	1560
ATACCTTGA AAAAGAGGGC TGTAAGATT ACGATGTGC TCGATAGTA GGATATAGGT	1620
TCTGCAAGGA CTTCGGGGC TTTATTOCT CATTACTCG GACTTAAIT GCAATGAGGC	1680
AAGATATATA GAAGAAATG AATOCACAA TTGACCGAT CGAAAGAAA ATGCTCGATT	1740
ATAGGCAVAG GGCTATTAA TTGCTTGCA ACAGCATCTT AOCCAAGAG TGGTTACCA	1800
TAATTGAAA TGGAGAAATA AATTGTGA AATTGGCGA GTTTATAAAC TCTTACATGG	1860
AAAAACAGAA GGAAAAGTT AAAACAGTAG AGATACTGA AGTCTCGAA GTAAACMAC	1920
TTTTTGCAIT CTCATTCAAC AAAAATCA AAGAAAGTA AGTCAAAAA GTCAAGCCC	1980
TCATAAGACA TAAGTATBA GGGAAAGCTT ATGAGATTCA GCTTAGCTCT GGTAGMAAA	2040
TTAACATAAC TGCTGGCCAT AGTCGTTTA CAGTIAGAA TGGAGAAATA AAGGAAGTTT	2100
CTGGAGATGG GATAAAGAA GGTGACCTTA TTGTAGCAC AAGAAAATT AACTCATG	2160
AAAAAGGGT AAGCATTAAC ATTCOGAGT TAATCTCAGA TCTTCOGAG GAAGAACAG	2220
CGACATTGT GATGAGATT TCAGCCAAG GCAGAAAGA CTCTTTTAA GGAATGCTGA	2280

Fig. 6

【図10】

GAACITTAAG GTGGATGTTT GGAGAAGAA ATAGAAGGAT AAGAACAATT AATOGCTATT	2340
TGTTCCATCT OGAAAACTA GGCTTATCA AACTACTGOC OOGGGATAT GAAGTTACTG	2400
ACTGGGAGAG ATTAAAGAA TATAACAAC TTACAGAGAA GCTTGCTGGA AGGTTAAGT	2460
ACAAGGAAA CAAGAGAG TATTAGTAA TGTTCAACA GATCAAGGAT TTTATATCTT	2520
ACTTCCACA AAAGAGCTC GAAGAATGGA AAATTGGAAC TCTCAATGGC TTTAGAACGA	2580
ATTGTATTCT CAAGTGGAT GAGGATTTTG GGAAGCTCT AGGTTACTAT GTTAGTGAGG	2640
GCTATGCGAG TCACAAAAA AATAAACTG GTGGTATCAG TTATTGGTG AGCTTTTACA	2700
ATGAGGACCC TAATGTTCTT GAGAGCATGA AAAATGTTGC AGAAAAATTC TTGGGCAAGG	2760
TTAGAGTTGA CAGAAATGC GTAGTATAT CAAGAAGAT GGCATACTTA GTTATGANAT	2820
GGCTCTGTGG AGCATTAGOC GAAACAAGA GAATTCCTTC TGTTATACTC AACTCTCOOG	2880
AAOOGGTAAG GTGGTCATTT TTAGAGGOGT ATTTTACAGG OGATGGAGAT ATTACATOCAT	2940
CAAAAAGGTT TAGGCTCTCA ACAAAAAGOG AGCTCTTGC AATCAGCTT GGTTCCTOC	3000
TGAATCTTT GGGAAATOC TCTGTAAAGA TAGGCTTTGA CAGTGGGGTC TATAGAGTGT	3060
ATATAAATGA AGAAGTCAA TTTCACAAA CGTCTAGGGA GAAACACA TACTACTCTA	3120
ACTTAATTC CAAGAGATC CTAGGGAGG TGTTTGAAA AGAGTTCCAA AAGTACATGA	3180
CGTTCAAGAA ATTTAAAGAG CTGTGTACT CTGGAAACT TAACAGGGAG AAAGOCVAGC	3240
TCTTGGAGTT CTTCAATTAAT GGAGATATTG TOCTTGACAG AGTCAAAAGT GTTAAAGAAA	3300
AGGACTATGA AGGGTATGTC TATGAOCTAA GOGTTGAGGA TAAAGAGAAC TTTCTTGTG	3360
GTTTTGGTTT GCTCTATGCT CACAACAGCT ATTAAGGCTA TATGGGGTAT CCTAAGGCVA	3420
GATGGTACTC GAAGGAATGT GCTGAAGOG TTACCGCATG GGGGAGACAC TACATAGAGA	3480

Fig. 6

[図 11]

TCGCGATAG AGAAATAGAG GAAAAGTTGG GCCTTAAGGT TCCTTATGGG GACAGTGTCT	3540
CAGGAGAAAG TGAGATCATA ATAAGGCCAA ACGGAAAGAT TAGATTGTG AAAATTAAGG	3600
ATCTTTCTC TAAGGTGGAC TACAGCATTG GCGAAAAGA ATACTGCATT CTGTAAGGTG	3660
TTGAAGCACT AACTCTGGAC GATGAAGGAA AGCTTGTCTG GAAGCCCGTC CCTTAAGTGA	3720
TGAGGCACAG AGCGATAAA AGATGTTTC GCATCTGGCT GACCAACAGC TGGTATATAG	3780
ATGTTACTGA GGATCATTCT CTCATAGGCT ATCTAACAC GTCAAAAGG AAACTGCGA	3840
AAAAAATGG GGAAGACTA AAGGAAGTAA AGCCTTTTGA ATTAGGCAAA GCAGTAAANT	3900
CGCTCATATG CCAAAATGCA CCGTTAAGG ATGAGAATAC CAAACTAGC GAAATAGCG	3960
TAAATTCIG GGAGCTGTA GGATTGATTG TAGGAGATGG AAACTGGGGT GGAGATTCTC	4020
GTGGGGCGA GTATTATCTT GGACTTTCAA CAGGCAAGA TGCAGAAGAG ATAAAGCWA	4080
AACTTCTGGA ACOOCTAAAA ACTTATGGAG TAATCTCAA CATTACCCA AAAAAGGAGA	4140
AAGGGGACTT CAACATCTTG GCAAGAGOC TTGTAAAGTT TATGAAAAGG CACTTTAAGG	4200
ACGAAAAGG AAGACGAAA ATTCCAGGT TCATGTATGA GCTTCGGTT ACTTACNTAG	4260
AGGCATTTCT ACGAGGACTG TTTTCAGCTG ATGGTACTGT AACTATCAGG AAGGGAGTTC	4320
CAGAGATCG GCTAACAAAC ATTGATGCTG ACTTTCCTAG GGAAGTAAGG AAGCTTCTGT	4380
GGATTGTGG AATTICAAAT TCAATATTTG CTGAGACTAG TOCAAATGGC TACTATGGTG	4440
TTTCTACTGG AACCTACTCA AAGCATCTAA GGATCAAAA TAAGTGGGCT TTTGCTGAAA	4500
GGATAGGCTT TTAAATOGAG AGAAGCAGA AGAGACTTTT AGAACATTTA AATCAGCGA	4560
GGTAAAAG GAATACATA GATTTCGCT TTGATCTTGT GCATGTGAAA AAAGTGGTAG	4620

Fig. 6

【図12】

AGATACCATA CGAGGGTTC GTTATGACA TTGAAGTOGA AGAGAGCAT AGGTTCTTTG	4680
CAAACAACAT CCTGGTACAC AATACTGAG GCTTTTATGC CACAATAOC GGGGAAAGC	4740
CTGAATCAT TAAAAAGAAA GCGAGGAAT TOCTAACTA CATAAATOC AAACCTOCAG	4800
GTCTGCTGA GCTTGAGTAT GAGGGCTTTT ACTTGAGAGG ATTCTTTGTT ACAAAAGC	4860
GCTATGCTAT CATAGATGAA GAGGGCAGGA TAACACAAG GGGCTTGGA GTAGTAGGA	4920
GAGATTGAG TGAGATAGCT AAGGAGCTC AGCNAAGGT TTTAGAGGCT ATACTTAAG	4980
AGGGAAGTGT TGA AAAAGCT GTAGAAGTG TTAGAGATGT TGTAGAGAA ATAGCAAAAT	5040
ACAGGGTTC ACTTGAAAG CTGTATATC ATGAGCAGAT TAOCAGGAT TTAAGGACT	5100
ACAAAGCAT TGGCCTCAT GTGCGATAG CAANAAGCT TGOOGCTAGA GGGATTAAG	5160
TGAACCGGG CACAATAATA AGCTATATC TTCTCAAAG GAGCGAAG ATAGOGATA	5220
GGTAATTTT ACTTACAGAA TAGATCTA GAAACACAA GTAGATOC GACTACTACA	5280
TAGAAAACA AGTTTTGCG GCGTACTTA GGTACTOGA AGGTTTGA TACAGAAAG	5340
AGGATTAAAG GTATCAAAG TCAAAACAA CCGGCTTGA TGCATGGCTC AAGAGGTAGC	5400
TCTGTGCTT TTATGTCAA GTTCTOOGC GATCTCTCT ATCTCTCTT TGTATTCTGC	5460
TATGTGGTT TCAATCACTA TTAAGTAGTC CGCAAGOC ATAAGCTTC CAATTCAAA	5520
CTTGAAGCTT TTAGTCTC TGGCTCAA TTACTOCAT GTTTTGGAT CGTGGCTCT	5580
CGCTCTCTG CTAAGCTCT CGAATCTTT TCTTGGOGAA GAGTGACAG CTATGATGAT	5640
TATCTCTOC TCTGGAAG CATCTTAAA CGTCTGAAT TCATCTAGAG AACTACTOC	5700
GTOGATTATA ACTGCTTGT ACTTCTTAG TAGTCTTTT AACTTTGGA TGTTAATTT	5760
TGCAAGGCA TTGTGOCOA GCTCTGCT AAGCTGAAT CTCACACTGT TCATACCTC	5820
GGGAGTTCTT GGGATOC	5837

Fig. 6

[図13]

Region III: ASP ... GLN ... ALA ... LYS ... ASN SER ... TYR GLY ... GLY 1100 ALA ... THR ... GLY ARG

Left Junction: ASP TYR ARG GLN ARG ALA ILE LYS LEU LEU ALA ASN SER ILE LEU PRO ASN GLU

Right Junction: LEU LEU TYR ALA HIS ASN SER TYR TYR GLY TYR GLY 1100 ALA GLU SER VAL THR ALA TRP GLY ARG

Fig. 7

[図18]

nt 1721 CGAAGAGAA ATGCTCGATT ATAGGCAAG GGCTATTAA TTCCTGCAA ACAGCATCTT ACCC . . .

nt 3375 . . . TATGCTCACA ACAGCTATTA CGGCTATATG GGGTATCTTAA . . .

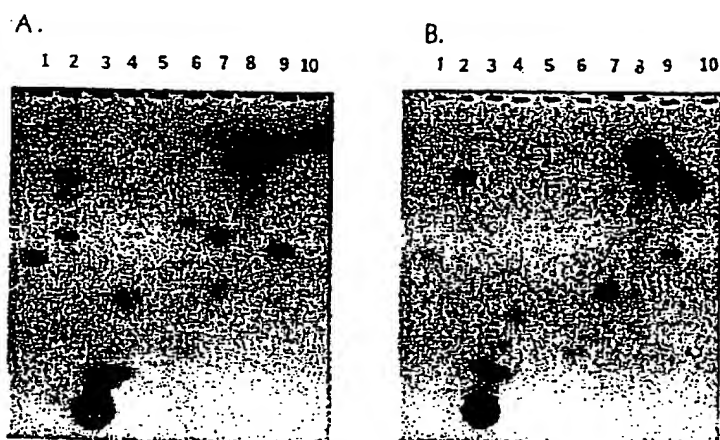
5' CGAAGAGAA ATGCTCGATT ATAGGCAAG GGCTATTAA TTCCTGCAA ACAGCTATTA CGGCTATATG GGGTATCTTAA . . .

3' TAGCTTTCCTT TACGAGCTAA TATCGGTTTC CCGATATTT ACGATCTGTT TGTCGATAT GGGATATAC CCGATGCTT 5'

Fig. 12

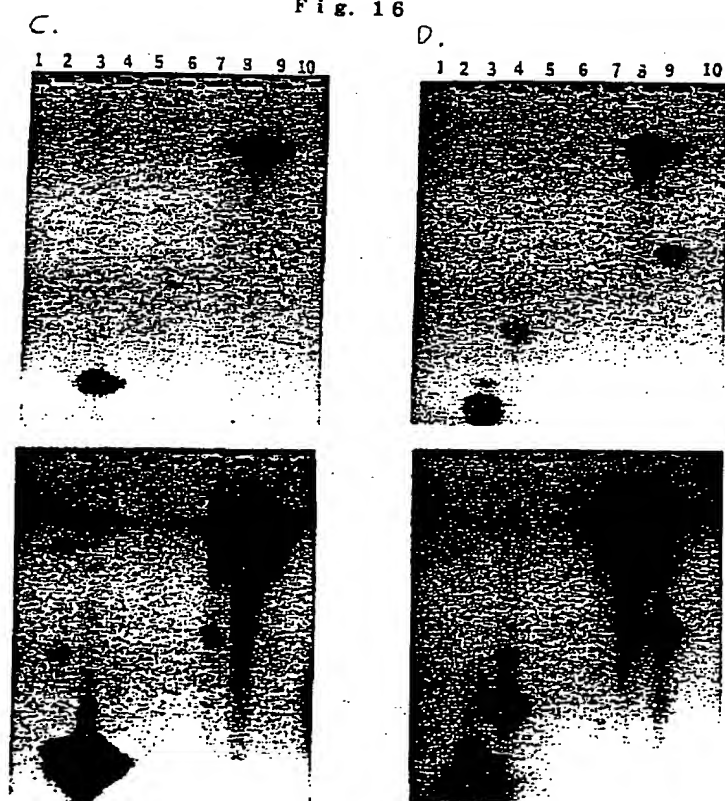
【図22】

Fig. 16



【図23】

Fig. 16



【図24】

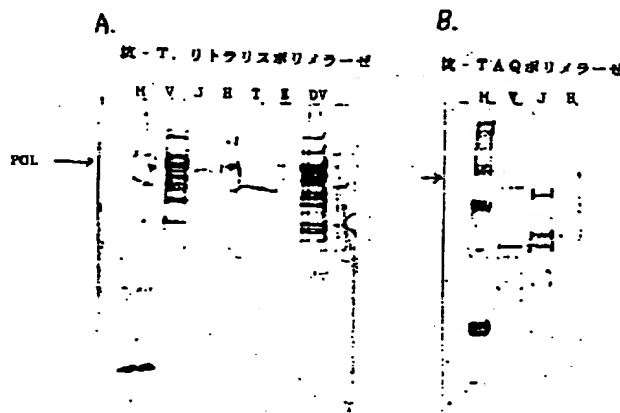


Fig. 17

【図26】

TTGAATTTAATGCTGTCCGGGACGTTATCTCACTAATGCCAGAGGAAGAA
 CTGAAGGAATGGCGTATTGGAAGTAGAAATGGATTCAGAATGGGTACGTT
 CGTAGATATTGATGAAGATTTTGCCAAGCTTCTTGGCTACTATGTGAGCG
 AGGGAAGTGCGAGGAAGTGGAAGAATCAAACCTGGAGGTGGAGTTACACT
 GTGAGATTGTACAACGAGAACGATGAAGTTCTTGACGACATGGAACACTT
 AGCCAAGAAGTTTTTTGGGAAAGTCAAACGTGGAAAGAACTATGTTGAGA
 TACCAAAGAAAATGGCTTATATCATCTTTGAGAGCCTTTGTGGGACTTTG
 GCAGAAAACAAAAGGGTTCCTGAGGTAATCTTTACCTCATCAAAGGGCGT
 TAGATGGGCCTTCCTTGAGGGTTATTTTCATCGGCGATGGCGATGTTTACC
 CAAGCAAGAGGGTTCGCCTATCAACGAAGAGCGAGCTTTTAGTAAATGGC
 CTTGTTCTCCTACTTAACCTCCCTTGGAGTATCTGCCATTAAGCTTGGATA
 CGATAGCGGAGTCTACAGGGTTTATGTAAACGAGGAACCTAAGTTTACGG
 AATACAGAAAGAAAAAGAATGTATATCACTCTCACATTGTTCCAAAGGAT
 ATTCTCAAAGAACTTTTGGTAAGGTCTTCCAGAAAAATATAAGTTACAA
 GAAATTTAGAGAGCTTGTAGAAAATGGAAAACCTTGACAGGGAGAAAGCCA
 AACGCATTGAGTGGTTACTTAACGGAGATATAGTCCTAGATAGAGTCGTA
 GAGATTAAGAGAGAGTACTATGATGGTTACGTTTACGATCTAAGTGTCGA
 TGAAGATGAGAATTCCTTG

Fig. 18

【図 25】

GGATCCCTCTCTTTTTGGTAACCCCATACGTCATTCCCTCAACCAAACT
 TCAGCATCGTTGCAGTGGTCAGTGTGTCTGTGGGAGATGAAGAGGACGTC
 GATTTTTCTGGGGICTATCTTGTATCTCCACATTCTAACTAACGCTCCAG
 GCCCAGGATCAACGTAGATGTTTTGCTCGCCTTAATGAAGAAGCCACCA
 GTGGCTCTTGCTGCGTTATCGTGACGAACCTTCCACCACCGCCACCGAG
 AAAAGTTATCTCTATCATCTCACACCTCCCCATAACATCACCTGCTCAA
 TTTTTAAGCGTTCTTAAAGGCTTAAATACGTGAATTTAGCGTAAATTATT
 GAGGGATTAAGTATGATACTTGACGCTGACTACATCACCGAGGATGGGAA
 GCCGATTATAAGGATTTTCAAGAAAGAAAACGGCGAGTTTAAGGTTGAGT
 ACGACAGAACTTTAGACCTTACATTTACGCTCTCCTCAAAGATGACTCG
 CAGATTGATGAGGTTAGGAAGATAACCGCCGAGAGGCATGGGAAGATAGT
 GAGAATTATAGATGCCGAAAAGGTAAGGAAGAAGTTCTGGGGAGGCCGA
 TTGAGGTATGGAGGCTGTACTTTGAACACCCTCAGGACGTTCCCGCAATA
 AGGATAAGATAAGAGAGCATTCCGCAGTTATTGACATCTTTGAGTACGA
 CATTCCGTTTCGCGAAGAGGTACCTAATAGACAAAAGGCCTAATTCCAATGG
 AAGGCGATGAAGAGCTCAAGTTGCTCGCATTTGACATAGAAACCCTCTAT
 CACGAAGGGGAGGAGTTTCGCGAAGGGGCCATTATAATGATAAGCTATGC
 TGATGAGGAAGAAGCCAAAGTCATAACGTGGAAAAAGATCGATCTCCCGT
 ACGTCGAGGTAGTTTCCAGCGAGAGGGAGATGATAAAGCGGTTCTCAAG
 GTGATAAGGGAGAAAGATCCCGATGTTATAATTACCTACAACGGCGATTCT
 TTTTCGACCTTCCCTATCTAGTTAAGAGGGCCGAAAAGCTCGGGATAAAGC
 TACCCCTGGGAAGGGACGGTAGTGAGCCAAAGATGCAGAGGCTTGGGGAT
 ATGACAGCGGTGGAGATAAAGGGAAGGATACACTTTGACCTTACCACGT
 GATTAGGAGAACGATAAACCTCCCAACATACACCCTCGAGGCAGTTTATG
 AGGCAATCTTCGGAAAGCCAAAGGAGAAAGTTTACGCTCACGAGATAGT
 GAGGCCTGGGAGACTGGAAGGGACTGGAGAGAGTTGCAAAGTATTCAAT
 GGAGGATGCAAAGGTAACGTACGAGCTCGGTAGGGAGTTCTTCCCAATGG
 AGGCCCAGCTTTCAAGGTTAGTCGGCCAGCCCCCTGTGGGATGTTTCTAGG
 TCTTCAACTGGCAACTTGGTGGAGTGGTACCTCCTCAGGAAGGCCTACGA
 GAGGAATGAATTGGCTCCAACAAGCCGGATGAGAGGGAGTACGAGAGAA
 GGCTAAGGGAGAGCTACGCTGGGGGATACGTTAAGGAGCCGGAGAAAGGG
 CTCTGGGAGGGGTTAGTTTCCCTAGATTTTACGAGCCTGTACCCCTCGAT
 AATAATCACCCATAACGTCTCACCGGATACGCTGAACAGGGAAGGGTGTA
 GGAATACGATGTCCGCCCCAGAGGTTGGGCACAAGTTCTGCAAGGACTTC
 CCGGGGTTTATCCCCAGCCTGCTCAAGAGGTTATTGGATGAAAGGCAAGA
 AATAAAAAGGAAGATGAAAGCTTCTAAAGACCCCAATCGAGAAGAGATGC
 TTGATTACAGGCAACGGGCAATCAAAATCCTGGCAAACAGCATTTTACCG
 GAAGAATGGGTTCCACTAATTAAAAACGGTAAAGTTAAGATATTCCGCAT
 TGGGGACTTCGTTGATGGACTTATGAAGGCGAACCAAGGAAAAGTGAAGA
 AAACGGGGGATACAGAAGTTTTAGAAGTTGCAGGAATTATGCGTTTTCC
 TTTGACAGGAAGTCCAAGAAGGCCCGTGTAAATGGCAGTGAAGCCGTGAT
 AAGACACCGTTATTCCGGAAATGTTTATAGAATAGTCTTAAACTCTGGTA
 GAAAAATAACAATAACAGAAGGGCATAGCCTATTTGTCTATAGGAACGGG
 GATCTCGTTGAGGCAACTGGGGAGGATGTCAAAATTGGGGATCTTCTTGC
 AGTTCCAAGATCAGTAAACCTACCAGAGAAAAGGGAACGCTTGAATATTG
 TTGAACCTTCTTGAATCTCTCACCGGAAGAGACAGAAGATATAATACTT
 ACGATTCCAGTTAAAGGCAGAAAGAATTCTTCAAGGGAATGTTGAGAAC
 ATTACGTTGGATTTTTTGGTGAGGAAAAGAGAGTAAGGACAGCGAGCCGCT
 ATCTAAGACACCTTGAAAATCTCGGATACATAAGGTTGAGGAAAATTGGA
 TACGACATCATTGATAAGGAGGGGCTTGAGAAATATAGAACGTTGTACGA
 GAAACTTGTTGATGTTGTCCGCTATAATGGCAACAAGAGAGATATTTAG

Fig. 18

【図27】

T. リトラリスDNAポリメラーゼ（下段）に対するピロコッカスDNAポリメラーゼ（上段）の
 演繹したアミノ酸配列のベストヒットにおける比較

291 から 5401 までの T. リトラリス配列の
 1 から 1100 までの T. リトラリスペプチドに対する

363 から 3420 までのピロコッカス配列の
 1 から 1019 までのピロコッカスペプチドのベストフィット

類似性パーセント率：83.219

総同源性パーセント率：68.302

```

1 MILDADYITEDGKPIIRIFKKENGFEKVEYDRNFRPYIYALLKODSQIDE 50
  ||||.||||.|||||||||||||||:|.:|:|||||||||||:|:|
1 MILDTDYITKDGKPIIRIFKKENGFEKIELDPHFQPIYIYALLKODSAIEE 50

51 VRKITAERHGKIVRIIDA EKVRKKELG RPIEVWRLYFEHPQDVPAIRDKI 100
  ::|:|:|||||:|:|:| |||||:|:|:|:|:|:|:|:|:|:|:|:|:|:|
51 IKAIKGERHGKTVRVLD AVKVRKKELG REVEVWKLIFEHPQDVPAIRGKI 100

101 REHSAVIDIFEYDIPFAKRYLIDKGLIPMEGDEELKLLAFDIETLYHEGE 150
  |||.||:|:|:|:|:|:|:|:|:|:|:|:|:|:|:|:|:|:|:|:|:|:|:|
101 REHPAVVDIYEYDIPFAKRYLIDKGLIPMEGDEELKLLAFDIETFYHEGD 150

151 EFAKGPIIMISYADEEEAKVITWKKIDLPYVEVVSSEMIKRFKLVIRE 200
  ||:|:|:|:|:|:|:|:|:|:|:|:|:|:|:|:|:|:|:|:|:|:|:|
151 EFGKGEIIMISYADEEEARVITWKNIDLPYVDVVSNERMIKRFVQVYKE 200

201 KDPDVIITYNGDSFDLPYL VKRAEKLGIKPLGRDG..SEPKMORIGDMT 248
  |||||:|:|:|:|:|:|:|:|:|:|:|:|:|:|:|:|:|:|:|:|:|:|:|
201 KDPDVIITYNGDNFDLPYL KRAEKLGVRLVLGRDKEHPEPKIQRMGDSF 250

249 AVEIKGRIHFDLYHVIRRTINLPTYTLEAVYEAFGKPKKVKYAHEIAEA 298
  |||||:|:|:|:|:|:|:|:|:|:|:|:|:|:|:|:|:|:|:|:|:|:|:|
251 AVEIKGRIHFDLFFVVRTINLPTYTLEAVYEA VLGKTKSKLGAEI IAAI 300

299 WETGKGLERVAKYSMEDAKVTYELGREFFPMEAQLSRLVGQPLWDVSRSS 348
  |||:|:|:|:|:|:|:|:|:|:|:|:|:|:|:|:|:|:|:|:|:|:|:|
301 WETESMKKLAQYSMEDARATYELGKEFFPMEAELAKLIGQSVWDVSRSS 350

349 TGNLVEWYLLRKAYERNELAPNKPDEREYERRLRESYAGGYVKEPEKGLW 398
  |||||:|:|:|:|:|:|:|:|:|:|:|:|:|:|:|:|:|:|:|:|:|:|:|
351 TGNLVEWYLLRVAYARNELAPNKPDEEEYKRLRTTYLGGYVKEPEKGLW 400

399 EGLVSLDFRSLYPSIIITHNVSPDTLNREGCREYDVAPEVGHKFKCDFPG 448
  |.:|:|:|:|:|:|:|:|:|:|:|:|:|:|:|:|:|:|:|:|:|:|:|
401 ENIIYLDFRSLYPSIIIVTHNVSPDTLEKEGCKNYDVAPIVGYRFCKDFPG 450

449 FIPSLKRLRLDERQEIKRKM KASKDPIEKKMLDYRQRAIKILANSILPEE 498
  ||||:| |.:|:|:|:|:|:|:|:|:|:|:|:|:|:|:|:|:|:|:|:|:|:|
451 FIPSILGDLIAMRQDIKKMKSTIDPIEKKMLDYRQRAIKLLANSILPNE 500

499 WVPLIKNGKVKIFRIGDFVDGLMKANQGKVKKTGDETVLEVAGIHAFSFD 548
  |:|:|:|:|:|:|:|:|:|:|:|:|:|:|:|:|:|:|:|:|:|:|:|
501 WLPPIIENG EIKFVKIGEFINSYMERQKENVKIVENTEVLEVNNLFAFSFN 550
  
```

Fig. 19

【図28】

```

549 RKS K K A R V M A V K A V I R H R Y S G N V Y R I V L N S G R K I T I T E G H S L F V Y R N G D L 598
      : | | . . | . | | | : | | : | . . . | | | . | | | | . | | | | . | | | : |
551 K K I K E S E V K K V K A L I R H K Y K G K A Y E I Q L S S G R K I N I T A G H S L F T V R N G E I 600
      : | | | : | | | : | | : | | | : | | | : | | | : | | | : | | | : | | | : |
599 V E A T G E D V K I G D L L A V P R S V N L P E K R E R L N I V E L L L N L S P E E T E D I I L T I 648
      | . . | : : | | | : . . | : : . | | . : | | . | | : : | | . | | : : | |
601 K E V S G D G I K E G D L I V A P K K I K L N E K G V S I N I P E L I S D L S E E T A D I V M T I 650
      . . | | | | | | | | | | | | | | | | : | : | | . | | | | | | . | | . | |
649 P V K G R K N F F K G M L R T L R W I F G E E . K R V R T A S R Y L R H L E N L G Y I R L R K I G Y 697
      . . | | | | | | | | | | | | | | | | : | : | | . | | | | | | . | | . | |
651 S A K G R K N F F K G M L R T L R W M F G E E N R R I R T F N R Y L F H L E K L G L I K L L P R G Y 700
      : | | | : | | | : | | | : | | | : | | | : | | | : | | | : | | | : | | | : |
698 D I I D K E G L E K Y R T L Y E K L V D V V R Y N G N K R E Y L V E F N A V R D V I S L M P E E L 747
      : . . | . | | . | | : | | | | . : | : | | | | | | | | | | | | : | | : | | . : | |
701 E V T D W E R L K K Y K Q L Y E K L A G S V K Y N G N K R E Y L V M F N E I K D F I S Y F P Q K E L 750
      : | | : | | | : | | | : | | | : | | | : | | | : | | | : | | | : | | | : | | | : |
748 K E W R I G T R N G F R M G T F V D I D E D F A K L L G Y Y V S E G S A R K W K N Q T G G W S Y T V 797
      | | : | | | | | | | . . . . : | | | : | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | |
751 E E W K I G T L N G F R T N C I L K V D E D F G K L L G Y Y V S E G Y A G A Q K N K T G G I S Y S V 800
      : | | | : | | | : | | | : | | | : | | | : | | | : | | | : | | | : | | | : | | | : |
798 R L Y N E N D E V L D D M E H L A K K F F G K V K R G K N Y V E I P K K M A Y I I F E S L C G T L A 847
      : | | | | : . : | | : . : | . | | | | | : : | : | . | . | | | | : : : | | | . | |
801 K L Y N E D P N V L E S M K N V A E K F F G K V R V D R N C V S I S K K M A Y L V M K C L C G A L A 850
      : | | | : | | | : | | | : | | | : | | | : | | | : | | | : | | | : | | | : | | | : |
848 E N K R V P E V I F T S S K G V R W A F L E G Y F I G D G D V H P S K R V R L S T K S E L L V N G L 897
      | | | : | . | | : | | . . . | | . | | | : | | . | | | | : | | | | | | | | | | | | . | |
851 E N K R I P S V I L T S P E P V R W S F L E A Y F T G D G D I H P S K R F R L S T K S E L L A N Q L 900
      : | | | : | | | : | | | : | | | : | | | : | | | : | | | : | | | : | | | : | | | : |
898 V L L L N S L G V S A I K L G Y D S G V Y R V Y V N E E L K F T E Y R K K K N V Y H S H I V P K D I 947
      | : | | | | | : | . : | : | : | | | | | | | | | : | . | . : . . | | . | : : | | : |
901 V F L L N S L G I S S V K I G F D S G V Y R V Y I N E D L Q F P Q T S R E K N T Y Y S N L I P K E I 950
      : | | | : | | | : | | | : | | | : | | | : | | | : | | | : | | | : | | | : | | | : |
948 L K E T F G K V F Q K N I S Y K K F R E L V E N G K L D R E K A K R I E W L L N G D I V L D R V V E 997
      | : . . | | | | | | : : | | | : | | | : | | | : | | | : | | | : | | | : | | | : | | | : |
951 L R D V F G K E F Q K N M T F K K F K E L V D S G K L N R E K A K L L E F F I N G D I V L D R V K S 1000
      : | | : | | | : | | | : | | | : | | | : | | | : | | | : | | | : | | | : | | | : | | | : |
998 I K R E Y Y D G Y V Y D L S V D E D E N F L 1019
      : | . | : | | | | | | | : : : | | | |
1001 V K E K D Y E G Y V Y D L S V E D N E N F L 1022

```

Fig. 19

フロントページの続き

(51) Int. Cl. 5

識別記号

庁内整理番号

F I

技術表示箇所

// (C 1 2 N 15/54

C 1 2 R 1:01)

(72) 発明者 フランシオン・パーラー
 アメリカ合衆国、マサチューセッツ・
 02146、ブルツクリン、フラー・ストリー
 ト・74・エイ

(72) 発明者 レベツカ・クセラ
 アメリカ合衆国、マサチューセッツ・
 01915、ビバリー、ネプチューン・ストリ
 ート・29

(72)発明者 ウィリアム・イー・ジャック
アメリカ合衆国、マサチューセツツ・
01984、ウエーナム、メイフラワー・ドラ
イブ・31